

# УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ  
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ  
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ  
ЖУРНАЛ



*Аутоантитела против  
опухолеассоциированных  
антигенов*

*Модулирование образования  
активных форм азота  
ингредиентами растительных  
продуктов*

*Молекулярно-генетические  
аспекты внутрипеченочного  
холангиоцеллюлярного рака*

*Роль ABC-транспортёров  
в формировании лекарственной  
устойчивости к бортезомибу*



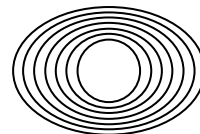
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

Журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор, зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью идентификатора цифрового объекта (DOI).

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»  
МИНЗДРАВА РОССИИ

# УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное  
бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский  
исследовательский центр  
онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России

Онлайн-версия журнала  
доступна по адресу:  
<http://umo.abvpress.ru/jour>

Е Ж Е К В А Р Т А Л Ы Н Ы Й   Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й   Р Е Ц Е Н З И Р У Е М Ы Й   Ж У Р Н А Л

**Целевая читательская аудитория:** онкологи, молекулярные биологи, генетики, биохимики, вирусологи, онкоэпидемиологи, химиотерапевты.

**Контент:** обзоры, мини-обзоры, краткие сообщения и полноразмерные экспериментальные статьи, комментарии ведущих специалистов.

Члены редакционной коллегии и авторы журнала – ведущие российские и зарубежные онкологи, молекулярные биологи, генетики, химиотерапевты и специалисты смежных специальностей.

О С Н О В А Н   В   2 0 1 4   Г .

1   Т О М 6  
'19

**Учредители:**

ФГБУ «НМИЦ онкологии  
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
ООО «ИД «АБВ-пресс»

**Адрес редакции:**

115478, Москва, Каширское шоссе, 24,  
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.  
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19  
e-mail: [abv@abvpress.ru](mailto:abv@abvpress.ru)  
[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)

**Прием статей:** онлайн на сайте  
<http://umo.abvpress.ru/jour>  
или по адресу [adv.mol.onc@ronc.ru](mailto:adv.mol.onc@ronc.ru)

**Выпускающий редактор Н.В. Жукова**  
**Корректор Т.Н. Помилуйко**  
**Дизайн Е.В. Степанова**  
**Верстка О.В. Гончарук**  
Служба подписки и распространения  
**И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,**  
[base@abvpress.ru](mailto:base@abvpress.ru)

**Руководитель проекта**  
**И.В. Гапонова, +7 (499) 929-96-19,**  
[i.gaponova@abvpress.ru](mailto:i.gaponova@abvpress.ru)

Журнал зарегистрирован  
в Федеральной службе по надзору

в сфере связи, информационных  
технологий и массовых коммуникаций  
(ПИ № ФС 77-57560 от 08.04.2014 г.)

**При полной или частичной  
перепечатке материалов ссылка  
на журнал «Успехи молекулярной  
онкологии» обязательна.**  
**Редакция не несет ответственности  
за содержание публикуемых  
рекламных материалов.**  
**В статье представлена точка  
зрения авторов, которая может  
не совпадать с мнением редакции.**

ISSN: 2313-805X (Print)  
ISSN: 2413-3787 (Online)

Успехи молекулярной онкологии.  
2019. Том 6. № 1. 1–76

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2019

Подписной индекс в каталоге  
«Пресса России» — 93562

Отпечатано в типографии  
ООО «Медиаколор»  
Тираж 1000 экз.

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

**Красильников Михаил Александрович**, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

## ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

**Зборовская Ирина Борисовна**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Якубовская Марианна Геннадиевна**, д.м.н., заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

## ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

**Гудкова Маргарита Владимировна**, к.б.н., ученый секретарь НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Берштейн Лев Михайлович**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

**Боженко Владимир Константинович**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики, ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

**Бойчук Сергей Васильевич**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей патологии, декан медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

**Глушанкова Наталья Александровна**, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Гудков Андрей Владимирович**, д.б.н., профессор, старший вице-президент по фундаментальной науке и заведующий отделом биологии клеточного стресса Института онкологии им. Розвелла Парка (Баффало, Нью-Йорк, США)

**Животовский Борис Давидович**, д.б.н., профессор, лауреат Государственной премии СССР, заведующий лабораторией исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», профессор Каролинского института (Стокгольм, Швеция)

**Имянитов Евгений Наумович**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

**Казанский Дмитрий Борисович**, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Карпухин Александр Васильевич**, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)

**Кжышковска Юлия Георгиевна**, д.б.н., профессор, руководитель отдела врожденного иммунитета и толерантности Института трансфузионной медицины и иммунологии медицинского факультета Мангейма университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

**Лазаревич Наталья Леонидовна**, д.б.н., профессор, заведующая отделом иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Мазуренко Наталья Николаевна**, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории онкоэкономики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Миркин Сергей Моисеевич**, именной профессор биологии Университета Тафтса (Медфорд, Орегон, США)

**Сергеева Наталья Сергеевна**, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

**Степанова Евгения Владиславовна**, д.м.н., директор Департамента комплексных программ и проектов Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Москва, Россия)

**Чевкина Елена Максимовна**, д.б.н., заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Чердынцева Надежда Викторовна**, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия)

**Юрсич Владимир**, профессор факультета медицинских наук Университета Крагуеваца (Крагуевац, Сербия)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Белицкий Геннадий Альтерович**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Гурцевич Владимир Эдуардович**, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Давыдов Михаил Иванович**, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

**Заридзе Давид Георгиевич**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

**Копнин Борис Павлович**, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Кубасова Ирина Юрьевна**, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Кушлинский Николай Евгеньевич**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Лихтенштейн Анатолий Владимирович**, д.б.н., руководитель группы биохимии опухолей отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

**Тюляндин Сергей Алексеевич**, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

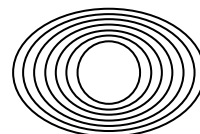
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

The journal is included in the Scientific Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor; it is registered in the CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

The journal's electronic version is available in the DOAJ.

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER OF ONCOLOGY, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

# ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



N.N. Blokhin National Medical  
Research Center of Oncology,  
Ministry of Health of Russia

Online version of the journal  
is available at:  
<http://umo.abvpress.ru/jour>

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

*Target audience: oncologists, molecular biologists, geneticists, biochemists, virologists, cancer epidemiologists, chemotherapists.*

*Information content: reviews, mini-reviews, brief communications and full-size research articles, comments of leading experts.*

*Editorial board members and authors of the journal are the leading Russian and foreign oncologists, molecular biologists, geneticists, chemotherapists and specialists of related professions.*

FOUNDED IN 2014

1 Vol. 6  
'19

**Founders:** N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; PH "ABV-press"

**Editorial Office:**  
Research Institute of Carcinogenesis,  
Floor 3, 24 Build. 15  
Kashirskoe Shosse, Moscow  
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.  
e-mail: [abv@abvpress.ru](mailto:abv@abvpress.ru)  
[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)  
**Article submission:** on-line  
at <http://umo.abvpress.ru/jour>  
or by e-mail to [adv.mol.onc@ronc.ru](mailto:adv.mol.onc@ronc.ru)

**Managing editor** N.V. Zhukova  
**Proofreader** T.N. Pomiluyko  
**Designer** E.V. Stepanova  
**Maker-up** O.V. Goncharuk  
**Subscription & Distribution Service**  
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,  
[base@abvpress.ru](mailto:base@abvpress.ru)

**Project Manager** I.V. Gaponova,  
+7 (499) 929-96-19,  
[i.gaponova@abvpress.ru](mailto:i.gaponova@abvpress.ru)

*The journal was registered  
at the Federal Service for Surveillance  
of Communications, Information*

*Technologies, and Mass Media  
(III No. ФС77-57560  
dated 08 April 2014).*

**If materials are reprinted in whole  
or in part, reference must necessarily  
be made to the journal "Uspekhi  
molekulyarnoy onkologii".**

**The editorial board is not responsible  
for advertising content.**

**The authors, point of view given  
in the articles may not coincide with  
the opinion of the editorial board.**

ISSN: 2313-805X (Print)  
ISSN: 2413-3787 (Online)

Uspekhi molekulyarnoy  
onkologii. 2019. Vol. 6  
No. 1. 1—76

© PH "ABV-Press", 2019

Pressa Rossii catalogue  
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC

1,000 copies

**EDITOR-IN-CHIEF**

**Krasil'nikov Mikhail A.**, *PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of Department of Experimental Biology of Tumors (Moscow, Russia)*

**DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF**

**Zborovskaya Irina B.**, *PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Yakubovskaya Marianna G.**, *PhD, DSc, Head of the Department of Chemical Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**EXECUTIVE EDITOR**

**Gudkova Margarita V.**, *PhD, Scientific Secretary of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**EDITORIAL BOARD**

**Berstein Lev M.**, *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)*

**Bozhenko Vladimir K.**, *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

**Boychuk Sergey V.**, *PhD, DSc, Professor, Head of the Department of General Pathology, Dean of the Faculty of Medicine and Biology, Kazan State Medical University (Kazan, Russia)*

**Gloushankova Natalia A.**, *PhD, DSc, Head of the Laboratory of Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Gudkov Andrey V.**, *PhD, DSc, Professor, Sr. Vice-President for Basic Science and Head of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)*

**Zhivotovskiy Boris D.**, *PhD, DSc, Professor, Laureate of the State Award of the USSR, Head of the Department of Apoptosis Mechanisms, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Professor of the Karolinska Institute (Stockholm, Sweden)*

**Imyanitov Eugeny N.**, *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)*

**Kazansky Dmitry B.**, *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Immune Regulation Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Karpukhin Aleksander V.**, *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)*

**Kzhyskovska Juliya G.**, *PhD, DSc, Professor, Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Heidelberg, Germany)*

**Lazarevich Natalia L.**, *PhD, DSc, Professor, Head of the Department of the Immunochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Mazurenko Natalia N.**, *PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Mirkin Sergey M.**, *Professor, White Family Department of Biology, Head in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)*

**Sergeeva Natalia S.**, *PhD, DSc, Professor, Head of the Prognostics of the Efficacy of Conservative Treatment Laboratory of the P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of National Medical Research Radiology Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Stepanova Evgenia V.**, *PhD, DSc, Director of the Department of Complex Programs and Projects, Ministry of Science and Higher Education of Russia (Moscow, Russia)*

**Tchevkina Elena M.**, *PhD, DSc, Head of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Tcherdyntseva Nadezhda V.**, *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia)*

**Jurisk Vladimir**, *Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Kragujevac, Serbia)*

**EDITORIAL COUNCIL**

**Belitsky Gennady A.**, *PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Chemical Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Gurtsevitch Vladimir E.**, *PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Davydov Mikhail I.**, *MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

**Zaridze David G.**, *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Department of Epidemiology and Prevention of Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

**Kopnin Boris P.**, *PhD, DSc, Professor, Head Researcher at the Cytogenetics Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Kubasova Irina Yu.**, *PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Kushlinskii Nikolay E.**, *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Clinical Biochemistry Laboratory, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Lichtenstein Anatoly V.**, *PhD, DSc, Head of the Tumor Biochemistry Group, Department of Experimental Tumor Biology of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

**Tjulandin Sergey A.**, *MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Scientific Research, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*



# Информация для авторов

При направлении статьи в редакцию журнала «Успехи молекулярной онкологии» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами.

## 1. Общие правила

Статья должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором проведена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения.

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

## 2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- название статьи,
- инициалы и фамилии всех авторов,
- ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов, а также их ORCID (при наличии),
- полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа,
- адрес учреждения (учреждений) с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
  - фамилия, имя, отчество полностью,
  - занимаемая должность,
  - ученая степень, ученое звание,
  - персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
  - персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: [http://elibrary.ru/projects/science\\_index/author\\_tutorial.asp](http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp)),
  - контактный телефон,
  - рабочий адрес с указанием индекса,
  - адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

## 3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

## 4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

**Оригинальная статья** – не более 12 страниц (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

**Описание клинических случаев** – не более 8 страниц.

**Обзор литературы** – не более 20 страниц.

**Краткие сообщения и письма в редакцию** – 3 страницы.

## 5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме – не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на источники литературы и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

## 6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),
- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т. д.),
- благодарности (раздел не является обязательным).

## 7. Иллюстративный материал

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

**Фотографии** представляются в форматах TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

**Рисунки, графики, схемы, диаграммы** должны быть редактируемыми, выполненными средствами Microsoft Office Excel или Office Word.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подрисуночными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи. Подписи к рисункам даются на русском и английском языках на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле. Все надписи на рисунках также должны быть переведены на английский язык.

**Таблицы** должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Вся информация, содержащаяся в таблице, включая ее название и примечание (если есть), должна быть переведена на английский язык.

## 8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, полимерная цепная реакция (ПЦР)).

## 9. Список литературы

На следующей после текста странице статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по порядку цитирования в тексте статьи, не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках начиная с 1 (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях – не более 20–25, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники, цитирование одного автора по работе другого недопустимо.

Включение в список литературы тезисов возможно исключительно при ссылке на иностранные (англоязычные) источники.

Ссылки на диссертации и авторефераты, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из неофициальных интернет-источников, не допускаются.

Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском в тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц. В ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице.

**Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.**

### Общие положения:

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях (см. информацию на сайте).

**Материалы для публикации принимаются** по адресу онлайн на сайте <http://umo.abvpress.ru/jour> или по адресу [adv.mol.onc@ronc.ru](mailto:adv.mol.onc@ronc.ru).

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

К 100-летию юбилею профессора Николая Петровича Мазуренко .....	8
---	---

**ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ**

<i>Н.В. Маршутина, Н.С. Сергеева, И.И. Алентов, А.Д. Каприн</i> Аутоантитела против опухолеассоциированных антигенов как класс серологических маркеров .....	10
<i>В.П. Дерягина, В.П. Реутов</i> Модулирование образования активных форм азота ингредиентами растительных продуктов при ингибировании канцерогенеза .....	18
<i>Б.Н. Гурмиков, Ю.А. Коваленко, В.А. Вишневский, А.В. Чжао</i> Молекулярно-генетические аспекты внутрипеченочного холангиоцеллюлярного рака: обзор литературы .....	37

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**

<i>Л.В. Спирина, А.К. Горбунов, И.В. Кондакова, Е.А. Усынин, Е.М. Слонимская</i> Связь молекулярных маркеров с эффективностью и временем ответа на андрогендепривационную терапию у больных раком предстательной железы .....	44
<i>Л.А. Лалетина, Н.И. Моисеева, Д.А. Климова, А.А. Ставровская</i> Роль ABC-транспортеров в формировании лекарственной устойчивости к бортезомибу при множественной миеломе .....	49
<i>Д.С. Кутилин, И.С. Никитин, О.И. Кит</i> Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки .....	57
<i>В.Е. Шевченко, И.С. Брюховецкий, Е.А. Савченко, Н.Е. Арноцкая</i> Изучение взаимодействия белков внеклеточного матрикса с рецепторами CD133 <sup>+</sup> стволовых клеток и CD133 <sup>-</sup> дифференцированных клеток глиомы .....	63

**НЕКРОЛОГ**

Памяти Ирины Борисовны Зборовской (07.01.1952–09.02.2019) .....	73
---	----

<b>Celebrating the centenary of Professor Nikolay Petrovich Mazurenko's birth .....</b>	<b>8</b>
---	----------

## REVIEWS

<i>N.V. Marshutina, N.S. Sergeeva, I.I. Alentov, A.D. Kaprin</i> <b>Autoantibodies against tumor-associated antigens as one class of serological markers .....</b>	<b>10</b>
<i>V.P. Deryagina, V.P. Reutov</i> <b>Modulation of the formation of active forms of nitrogen by ingredients of plant products in the inhibition of carcinogenesis .....</b>	<b>18</b>
<i>B.N. Gurmikov, Yu.A. Kovalenko, V.A. Vishnevsky, A.V. Chzhao</i> <b>Molecular genetic aspects of intrahepatic cholangiocarcinoma: literature review .....</b>	<b>37</b>

## EXPERIMENTAL REPORTS

<i>L.V. Spirina, A.K. Gorbunov, I.V. Kondakova, E.A. Usynin, E.M. Slonimskaya</i> <b>Association between the molecular markers, effect and time of response to the androgen-deprivation therapy in patients with prostate cancer .....</b>	<b>44</b>
<i>L.A. Laletina, N.I. Moiseeva, D.A. Klimova, A.A. Stavrovskaya</i> <b>The role of ABC transporters in drug resistance to bortezomib in multiple myeloma .....</b>	<b>49</b>
<i>D.S. Kutilin, I.S. Nikitin, O.I. Kit</i> <b>Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri .....</b>	<b>57</b>
<i>V.E. Shevchenko, I.S. Bryukhovetskiy, E.A. Savchenko, N.E. Arnotskaya</i> <b>Study of interaction between extracellular matrix proteins and receptors of CD133<sup>+</sup> stem cells and CD133<sup>-</sup> differentiated glioma cells .....</b>	<b>63</b>

## OBITUARY

<b>In memory of Irina Borisovna Zborovskaya (07.01.1952–09.02.2019) .....</b>	<b>73</b>
---	-----------



## К 100-летию юбилею профессора Николая Петровича Мазуренко 1919–1984

Еще в стенах Военно-медицинской академии (ВМА) им. С.М. Кирова (1936–1941 гг.) Н.П. Мазуренко проявил интерес к исследованиям в области инфекционной патологии. Его первые работы по микробиологии, актуальные для военного времени, были опубликованы в 1943 г., когда автор считался пропавшим без вести, а фактически находился в фашистском плену. К научной работе Николай Петрович смог вернуться лишь осенью 1946 г. в лаборатории профессора Л.А. Зильбера в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского, где продолжил начатую еще в ВМА работу по созданию вакцин против вирусов дальневосточного и шотландского энцефалитов. Впервые им был показан «факт специфического действия монохроматического света с длиной волны 2357 Å, который, избирательно действуя на нуклеиновые кислоты, приводит к инаktivации вируса». Эффективность полученных ультрафиолетовых вакцин многократно превышала эффективность формолвакцин и вакцин, полученных нагреванием.

Познакомившись с Л.А. Зильбером, Николай Петрович увлекся проблемой вирусологии опухолей. В 1953–1956 гг., работая в Киевском институте эпидемиологии и микробиологии, он пытался экспериментальным путем проверить предположение, по которому «опухолеродные вирусы произошли из неопухолеродных». В книге «Роль вирусов в этиологии лейкозов» (1962) он писал, что «инфекционные вирусы, длительное время культивируемые в опухоли, могут приобрести опухолеродные свойства по аналогии с явлением трансдук-



**6 января 2019 г. исполнилось  
100 лет со дня рождения  
Николая Петровича  
Мазуренко, одного  
из основоположников  
онковирусологии в нашей  
стране, ученого с мировым  
именем, более 40 лет  
посвятившего изучению  
вирусной природы опухолей**

ции микроорганизмов», чем предвосхитил выдвинутые в 1970-х годах предположения о клеточном происхождении опухолеродных вирусов в результате трансдукции клеточных генов.

В 1956 г. Н.П. Мазуренко открыл способность инфекционных вирусов активировать у мышей низкораковой линии латентный опухолеродный вирус, вызывающий, в свою очередь, у инфицированных мышей лейкоз, гемоцитобластоз-ретикулез. Таким образом, наряду с вирусно-радиационным, а позже описанным вирусно-химическим был от-

крыт новый механизм канцерогенеза – вирусно-вирусный. Открытое явление было высоко оценено научной общественностью, поскольку оно расширяло существующие представления о происхождении злокачественных опухолей. Выделенный из лейкозной ткани мышей вирус стал первым открытым в нашей стране и одним из первых в мире онкогенных ретровирусов, который в литературе носит имя автора «вирус Мазуренко». В дальнейшем справедливость открытого им и его сотрудниками явления была доказана на других моделях животных (куры, собаки) с использованием иных инфекционных вирусов. «Явление вирусного коканцерогенеза» было зарегистрировано в качестве открытия в 1982 г.

С 1962 по 1984 г. профессор Н.П. Мазуренко возглавлял лабораторию вирусологии лейкозов в ВОНЦ РАМН СССР и вместе с сотрудниками лаборатории вписал яркие страницы в историю отечественной онковирусологии. Так, в 1967 г. впервые была описана возможность фенотипического смешивания вирусов лейкозо-саркоматозного комплекса, принадлежащих животным разных видов – млекопитающим и птицам. Эти исследования были проведены в США только в 1977 г.

В 1967 г. внимание Николая Петровича привлек высокопатогенный вирус герпеса кур, вызывающий развитие опухолей и поражение нервов (вирус болезни Марека, ВБМ), как удобная естественная модель для изучения канцерогенеза, ассоциированного с герпес-вирусами. Появилась идея приготовить высокоэффективную вакцину против лим-

фомы Марека как прообраз вакцины против опухолей, индуцированных герпес-вирусом Эпштейна–Барр. Для решения проблемы было создано единственное в СССР хозяйство безлейкозных кур, эмбрионы которых стали необходимым субстратом для приготовления безлейкозной вакцины против лимфомы Марека. Были выделены и изучены 2 штамма ВБМ с различной патогенностью и отработан быстрый метод определения инфицирования кур патогенным ВБМ по присутствию вирусного антигена в эпителии перьевых фолликулов, являющихся основным источником распространения вируса. Высокая эффективность приготовленных в лаборатории вариантов вакцины против лимфомы Марека и успешно апробированных в полевых и жестких экспериментальных условиях на сотнях тысяч кур позволяла осуществить промышленную наработку отечественной вакцины, однако эта экономически важная для страны инициатива была похоронена в межведомственных коридорах системы социалистического хозяйствования.

Начиная с 1974 г. под руководством Н.П. Мазуренко впервые в СССР стали проводиться широкомасштабные исследования по изучению ассоциации герпес-вируса Эпштейна–Барр со злокачественными новообразованиями человека. Была подтверждена этологическая причастность вируса к возникновению ин-

фекционного мононуклеоза, рака носоглотки, определенных гистологических вариантов лимфомы Ходжкина. Был разработан и внедрен в клиническую практику метод серологической диагностики рака носоглотки, оказавшийся чрезвычайно полезным для диагностики этой формы рака в случаях опухолевого процесса, сопровождающегося метастазами в лимфатические узлы шеи без первично выявленного очага. Эти исследования, инициированные Николаем Петровичем 45 лет назад, активно продолжаются в лаборатории в настоящее время на молекулярном уровне.

Профессор Н.П. Мазуренко был национальным куратором международной программы «Вирусный канцерогенез» и председателем Всесоюзной проблемной комиссии по «Вирусологии и иммунологии опухолей». Он опубликовал более 230 научных работ, подготовил большое число кандидатов и докторов наук. Научные заслуги Николая Петровича получили широкое признание как у нас в стране, так и за рубежом. Ему присвоено звание заслуженного деятеля науки РСФСР, монография «Роль вирусов в этиологии лейкозов» была удостоена премии им. Д.И. Ивановского, а Академия наук Чехословакии отметила его высшей наградой – почетной золотой медалью им. Я. Пуркинье «За выдающиеся заслуги перед наукой и человечеством».

Николай Петрович был энтузиастом и романтиком науки, отличался широтой и независимостью научного мышления, стремился к проведению поисковых исследований, привлекал к этому молодых и энергичных ученых, владеющих современными методами. По его инициативе на базе лаборатории вирусного канцерогенеза в 1978 г. была создана лаборатория молекулярной биологии вирусов, которую возглавил проф. Ф.Л. Киселев.

Николая Петровича как ученого всегда характеризовали высокая принципиальность, бескомпромиссность, тщательность в планировании эксперимента и глубина анализа. Привлекательной чертой его личности было повышенное чувство справедливости, которое неизменно присутствовало при решении любых вопросов и на любом уровне. В жизни Николай Петрович был сердечным и отзывчивым человеком, любил жизнь и природу, был страстным охотником и рыбаком, прекрасным шахматистом, хорошо знал историю и литературу. Жизнь Николая Петровича Мазуренко может служить примером стойкости, принципиальности и бескомпромиссности большого ученого, его исследования внесли большой вклад в онковирусологию и значительно обогатили наши знания об опухолях и вызывающих их вирусах.

***В.Э. Гурцевич, Н.Н. Мазуренко***

# Аутоантитела против опухолеассоциированных антигенов как класс серологических маркеров

Н.В. Маршутина<sup>1</sup>, Н.С. Сергеева<sup>1,2</sup>, И.И. Алентов<sup>1</sup>, А.Д. Каприн<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3; <sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 119049 Москва, ул. Островитянова, 1

**Контакты:** Игорь Игоревич Алентов [prognoz.06@mail.ru](mailto:prognoz.06@mail.ru)

Обзор посвящен современным представлениям об аутоантителах (ААТ) как одном из классов опухолеассоциированных биомаркеров. Рассматриваются причины гуморального ответа организма в виде ААТ к различным опухолеассоциированным белкам при развитии и прогрессировании злокачественного опухолевого процесса. Собственные белки в процессе канцерогенеза могут сверхэкспрессироваться, стать мутантными, подвергнуться посттрансляционной модификации, аномально локализоваться, aberrantly деградировать, становясь иммуногенными и, как следствие, восприниматься иммунной системой как чужеродные. Обсуждаются преимущества ААТ в качестве биомаркеров перед их лигандами – опухолеассоциированными антигенами. Приведены данные по диагностической ценности некоторых ААТ, рассматриваются основные современные методы их исследования. Обсуждаются возможности использования ААТ в скрининге, направленном на активное выявление ранних стадий рака, а также для прогноза и мониторинга течения опухолевого процесса у онкологических больных в целях доклинического выявления рецидивов.

**Ключевые слова:** опухолеассоциированные антигены, аутоантитела, иммунный ответ, скрининг, прогноз течения опухолевого процесса

**Для цитирования:** Маршутина Н.В., Сергеева Н.С., Алентов И.И., Каприн А.Д. Аутоантитела против опухолеассоциированных антигенов как класс серологических маркеров. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(1):10–7.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-10-17

## Autoantibodies against tumor-associated antigens as one class of serological markers

N. V. Marshutina<sup>1</sup>, N. S. Sergeeva<sup>1,2</sup>, I. I. Alentov<sup>1</sup>, A. D. Kaprin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>P.A. Hertzen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3<sup>rd</sup> Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

<sup>2</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

This review is devoted to modern notions about autoantibodies (AAb) as one of classes of tumor biomarkers. Principles of humoral response by way of autoantibodies to different tumor-associated proteins in the process of malignant tumor progression are considered. During carcinogenesis self-proteins may become overexpressed, mutant, undergo posttranslational modification, localize abnormally, degrade aberrantly, becoming immunogenic and, as a result, be recognized by immune system as allogeneic. Advantages of AAb as biomarkers over its ligands – tumor antigens – are discussed.

Data regarding a diagnostic value of some AAb are given, modern methods of its assessment are considered. Possibilities of AAb using in screening, aimed at active diagnostics of cancer on early stages as well as prognosis and monitoring of patients with malignant diseases are discussed.

**Key words:** tumor antigens, autoantibodies, immune response, screening, prognosis of tumor outcome

**For citation:** Marshutina N.V., Sergeeva N.S., Alentov I.I., Kaprin A.D. Autoantibodies against tumor-associated antigens as one class of serological markers. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):10–7.

В решении проблемы активного выявления ранних форм онкологических заболеваний большое внимание уделяется поиску новых опухолеассоциированных маркеров. Одна из таких перспективных групп сывороточных опухолеассоциированных биомаркеров представлена аутоантителами (ААТ), мишенями которых являются специфические опухолеассоциированные

аутологичные антигены (ОААГ). Циркулирующие ААТ у онкологических больных были обнаружены в 1966 г. S. von Kleist и P. Burtin, а затем и другими исследователями, что привело к идентификации целого спектра представителей этой группы биомаркеров [1–3]. В литературе описан ряд преимуществ ААТ перед их лигандами – ОААГ в качестве серологических опухолевых

маркеров. Во-первых, циркулирующие антитела проявляют большую стабильность во времени по сравнению с соответствующими антигенами, поскольку последние подвергаются протеолизу, а антитела — очень ограниченно [1]. Во-вторых, иммунный ответ на ассоциированные с опухолью антигены сопровождается амплификацией клонов В-лимфоцитов и синтезируемых ими антител, так что ААТ можно обнаружить раньше и в больших количествах, чем сами антигены. Таким образом, продукция ААТ, являясь следствием противоопухолевого иммунологического надзора, предшествует манифестации клинических проявлений заболевания на несколько месяцев и даже лет [2–7]. В связи с этим ААТ против аутологических ОААГ считаются перспективными для использования в скрининговых программах в качестве неинвазивных лабораторных методов для раннего выявления злокачественных опухолей [1, 5]. В ряде работ обосновывается пригодность тестов на ААТ и для прогноза течения опухолевого процесса, доклинического выявления прогрессирования заболевания, а также для персонализации терапевтических подходов в онкологии [2, 3, 8]. Кроме этого, по мнению R. T. Fortner и соавт., иммуноферментный метод определения ААТ (ELISA) легко переводится на платформы клинической химии [4].

В последнее десятилетие инициировано большое количество исследований, направленных на идентификацию новых высокочувствительных ОААГ и последующего выявления специфичных к ним ААТ при злокачественных новообразованиях разных локализаций, на базе подходов, позволяющих одновременно оценить концентрации множества представителей данного класса биомаркеров. В этих целях используют описанные в ряде обзоров различные современные лабораторные методы: MAPPING (multiple affinity protein profiling — мультиаффинное профилирование белков), SEREX (serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning — серологический анализ опухолевых антигенов с помощью клонирования рекомбинантной ДНК), SERPA (serological proteome analysis — серологический анализ протеома), NAPP (nucleic acid programmable protein arrays — метод программируемых матриц белков на основе нуклеиновых кислот), технологию фагового дисплея, белковые микрочипы и др. [1–3].

С другой стороны, среди разработчиков методов ранней лабораторной онкодиагностики растет число сторонников использования не отдельных биомаркеров, а комплексов наиболее чувствительных из них для конкретных злокачественных заболеваний [6]. Примерами таких комплексных подходов являются алгоритмы: ROMA (risk of ovarian malignancy algorithm), основанный на сочетании CA125 и HE4, для раннего выявления рака яичников (РЯ), и оценка соотношения различных изоформ простатического специфического антигена (индекс здоровья предстательной железы) для диагностики рака предстательной железы и др. [9–14].

Внедрение современных генетических и протеомных методов исследования привело к созданию различных мультипанелей ОААГ и ААТ со сравнительно высокой чувствительностью и специфичностью для опухолей основных локализаций (рак легкого (РЛ), пищевода (РП), молочной железы (РМЖ), РЯ и др.) [3, 4, 15–17].

Существует ряд причин возникновения аутореактивного иммунного ответа в виде появления ААТ при развитии опухолевого процесса. Так, собственные белки в процессе канцерогенеза могут сверхэкспрессироваться, стать мутантными, подвергнуться посттрансляционной модификации, аномально локализоваться, aberrантно деградировать, становясь иммуногенными, и, как следствие, восприниматься иммунной системой как чужеродные [3, 18–20].

Одной из главных причин развития иммуногенности аутологических белков опухолевых клеток в процессе канцерогенеза считается их aberrантная сверхэкспрессия, т.е. увеличение антигенной нагрузки. Это, как предполагают, приводит к преодолению иммунологической толерантности в отношении собственных белков, воспринимаемых иммунной системой как ОААГ, и выработке ААТ у онкологических больных [2]. Известно, что в ряде случаев иммунный ответ у онкологических больных распознает неоантигены, которые экспрессируются только в опухолях [2, 15]. Однако, как отмечают P. Zaenker и соавт. [15], большинство опухолеассоциированных ААТ направлено против собственных антигенов, которые aberrантно экспрессированы (например, HER-2/neu, p53 и ras) [21, 22]. Иммуногенность p53 может инициироваться не только сверхэкспрессией его дикой, но и мутантной формы, которая накапливается в цитозоле и ядрах опухолевых клеток [21, 22].

Показано, что эктопическая экспрессия белков также может приводить к развитию гуморального иммунитета. Хорошо известен такой класс ОААГ, как антигены РЯ, или раково-тестикулярные (раково-гаметные) антигены (cancer-testis antigens (СТА)). В норме их экспрессию (преимущественно MAGE-1 и MAGE-4) можно обнаружить только в клетках яичек, где они вовлечены в разные этапы сперматогенеза, и в плаценте (т.е. в иммунопривилегированных тканях с малым числом антигенпредставляющих клеток) [23]. Повышенная экспрессия различных представителей СТА в соматических клетках ассоциирована с продукцией ААТ у больных с опухолями разных локализаций (РЯ, РМЖ, рак предстательной железы, почки, меланома и др.). Гены, кодирующие СТА, представлены более чем 240 членами из 70 семейств и объединены в 2 большие группы на основании локализации их на X- или Y-хромосоме [24]. Соответственно, СТА условно также можно разделить на 2 группы: белки, кодируемые генами, локализующимися на X-хромосоме (например, MAGE-A — Xq28, MAGE-B — Xp21, GAGE — Xp11.4–11.2, NY-ESO — Xq28, SSX-Xp11.2),



и локализующимися на других хромосомах (SCP-1 – 1p13, OY-TES-1 – 12p13.32). X-СТА составляют более половины всех представителей этой группы ОААГ. Известно несколько больших семейств СТА (MAGE, BAGE, GAGE, HAGE, PAGE, XAGE, LAGE, NY-ESO-1 и SAGE) и не менее 40 экспрессируемых в опухолях представителей, которые исследуются в качестве онкофетальных ОААГ, способных индуцировать образование ААТ [2, 23, 24].

Соматические мутации, которые приводят к усилению иммуногенности собственных белков через продукцию новых антигенных эпитопов, – это точечные мутации, сдвиг рамки считывания, а также расширение или усечение кодирующей последовательности [25]. Они также могут сопровождаться неправильной укладкой (фолдингом) белков, изменением их стабильности и локализации, что не остается незамеченным иммунной системой [3]. Кроме этого, пептиды ряда белков – продуктов мутантных генов обладают выраженной способностью образовывать комплексы с молекулами главного комплекса гистосовместимости, которые распознаются Т-лимфоцитами [2]. Такие белки индуцируют высокоспецифичный гуморальный ответ, опосредованный костимулирующими сигналами от Т-лимфоцитов (Т-хелперы включают гипермутационный механизм формирования и отбора клонов В-лимфоцитов, производящих антитела с высокой аффинностью взаимодействия с антигенами, а также механизм переключения в них изотипов тяжелых цепей антител и тем самым регулируют силу, продолжительность и эффективность иммунного ответа), в результате чего В-клетки продуцируют антигенспецифические антитела [3].

Посттрансляционная модификация белков (например, гликозилирование, фосфорилирование, окисление или протеолитическое расщепление) может индуцировать иммунный ответ путем продуцирования неоэпитопов. Как известно, иммунный ответ в виде продукции высокоаффинных антител (класса IgG) требует распознавания антигена как В-, так и Т-лимфоцитами [1, 3]. В итоге иммунный ответ против таких иммуногенных эпитопов ОААГ вызывает продукцию ААТ, которые в ряде случаев могут рассматриваться как серологические опухолеассоциированные биомаркеры [26].

Запускать гуморальный ответ способны внутриклеточные белки, которые в процессе злокачественной трансформации приобретают aberrantную локализацию и в дальнейшем при гибели опухолевых клеток попадают в кровь. Так, сверхэкспрессия и aberrantная локализация в цитозоле ядерного белка циклина В1 выявлены в клетках злокачественных опухолей различных локализаций [2, 27]. Кроме этого, у больных раком поджелудочной железы, толстой кишки, РЛ, РМЖ в сыворотке крови обнаружены высокие уровни ААТ к циклину В1 [2, 27]. Также в крови пациентов со злокачественными заболеваниями (рак предстательной

железы, почки, меланомы, РМЖ и др.) выявлены повышенные уровни как внутриклеточного белка цАМФ-зависимой протеинкиназы, так и ААТ к нему [2, 28].

Не совсем понятно, как некоторые известные ОААГ, являющиеся внутриклеточными белками, могут запускать гуморальный ответ [2].

Одна из гипотез предполагает, что aberrantная гибель опухолевых клеток сопровождается высвобождением модифицированных внутриклеточных белков, которые представляются иммунной системе в воспалительном окружении [29, 30]. Aberrantная гибель опухолевых клеток может носить характер дефектного апоптоза с неэффективным клиренсом апоптотических телец или других форм клеточной гибели, таких как некроз. Повторные циклы такой aberrantной гибели опухолевых клеток сопровождаются стойким выбросом в кровеносное русло модифицированных внутриклеточных белков [2].

Другая гипотеза основывается на установлении того факта, что при реализации апоптоза некоторые ОААГ могут инициировать миграцию лейкоцитов и незрелых дендритных клеток посредством взаимодействия со специфическими рецепторами, связанными с G-белками на этих клетках. Такая хемотаксисная активность тканеспецифических ОААГ связана с реализацией системы «сигналов опасности» из поврежденных тканей и направлена на их восстановление. Поскольку в норме ОААГ изолированы от взаимодействия с иммунной системой, то после поглощения незрелыми дендритными клетками и представления в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости они будут распознаваться Т-лимфоцитами как иммуногенные.

Также предполагается, что молекулы ОААГ, обладающие структурным сходством с перекрестно реагирующими чужеродными антигенами (структурная мимикрия), способны вызывать гуморальный ответ. ОААГ, образовавшие комплексы с белками теплового шока (шаперонами), в ряде случаев становятся иммуногенными за счет иммуномодуляторных свойств белков теплового шока [31, 32].

Потенциальными антигенами, вызывающими выработку ААТ, могут служить опухолеассоциированные пептиды, которые образуются из внутриклеточных белков опухолевых клеток. Например, у больных раком печени в сыворотке крови обнаруживают фрагменты кальретикулина – CALR (Са-связывающий белок эндоплазматического ретикулума) [28, 33].

Увеличивающийся список белков, против которых идентифицированы ААТ у больных со злокачественными новообразованиями разных локализаций, включает онкопротеины (например HER-2/neu, gas и c-MYC), опухолесупрессорные белки (p53), ингибиторы апоптоза (сурвивин), белки-регуляторы клеточного цикла (циклин В1), ассоциированные с митозом белки (протеин-F-центромеры), мРНК-связывающие белки (p62, IMP1 и Кос), белки-шапероны (STIP1), белки

теплого шока (Hsp70), СТА (например, NY-ESO-1, SSX2, MAGE и др.), металлопротеиназы (ММП-7), антиоксиданты (PrxVI) и др. [2, 20, 34, 35].

Например, стрессиндуцированный фосфопротеин 1 (STIP1), представитель семейства шаперонов, также известный как HOP, p60 и STI, распознается иммунной системой как ОААГ, вызывая гуморальный иммунный ответ в виде ААТ [36]. Повышенная экспрессия STIP1 была показана в тканях ряда злокачественных опухолей: раке поджелудочной железы, печени, РЯ и колоректальном раке [35]. Кроме этого, обнаружена связь повышенной экспрессии STIP1 с низкой выживаемостью онкологических больных [37, 38]. Повышенные уровни ААТ к STIP1 обнаружены в сыворотке крови больных РЯ и РП [35, 37]. Y.W. Xu и соавт. при валидации теста на ААТ к STIP1 сообщили о достаточно высокой (для начальных стадий) чувствительности теста на основе АТТ к STIP1 в обучающей когорте (35,7 %) и валидируемой когорте (38,5 %) больных плоскоклеточным РП (ПРП) при специфичности 90 % [35]. Вместе с тем причины повышения ААТ к белку-шаперону STIP1 остаются не изученными.

H. F. Zhang и соавт. [16] при создании диагностической панели ААТ для раннего выявления ПРП из 9 изученных ОААГ отобрали только 4 маркера: онкопротеин с-МЫС, белок HCCR/LETMD (отрицательный регулятор гена *p53*), опухолесупрессорный белок *p53* и многофункциональный белок *p62/IMP2*, который связывает убиквитин и регулирует активацию сигнального пути ядерного фактора  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ). Авторы установили высокую диагностическую чувствительность (67,59 %) и площадь под ROC-кривой (AUC) 0,838 при специфичности 86,42 % для панели ААТ против 4 указанных ОААГ. Сходная высокая чувствительность была продемонстрирована и в отношении ранних стадий ПРП – 66,85 % при AUC 0,830.

Y.W. Xu и соавт. в 2014 г. также представили панель из 6 ААТ к ОААГ (*p53*, NY-ESO-1, ММП-7, Hsp70, PRDX и Vmi-1) с высокой чувствительностью и специфичностью (45 и 95 % соответственно) для начальных стадий ПРП [6].

Еще в 2006 г. L. Zhong и соавт. в формате фагового дисплея отобрали 5 белков ткани немелкоклеточного РЛ (НКРЛ), на которые вырабатываются ААТ [5]. Результаты тестирования панели для выявления этих 5 видов ААТ на выборке из больных раком ( $n = 23$ ) и в контрольной группе ( $n = 23$ ) продемонстрировали AUC от 0,74 до 0,95. При их комбинации в модели логистической регрессии AUC достигла 0,99 (чувствительность 91,3 % при специфичности также 91,3 %). При тестировании этой диагностической панели на образцах из банка сывороток из клиники Мэйо (Рочестер, США) совпадение с клиническим диагнозом было продемонстрировано в 6/6 случаев распространенного НКРЛ, в 32/40 сывороток крови от больных НКРЛ, ретроспективно полученных за 1–5 лет до рентгенографического выявления рака в скрининговой

программе и в 49/56 контрольных образцов от здоровых лиц, подобранных с учетом возраста и риска развития РЛ [5].

Для измерения в сыворотке крови ААТ к 6 ОААГ (*p53*, NY-ESO-1, CAGE, GBU4-5, Annexin I и SOX2) в 2007 г. был разработан и валидирован тест Early Cancer Detection Test-Lung (EarlyCDT-Lung Test). Тест расценивался как положительный, если был повышен уровень хотя бы одного ААТ из панели. Чувствительность EarlyCDT-Lung Test для РЛ составила 39 % при специфичности 89 % [3, 17, 39, 40]. Затем тест был модифицирован для оценки панели ААТ к 7 ОААГ (*p53*, NY-ESO-1, CAGE, GBU4-5, SOX2, HuD и MAGE-A4), и хотя чувствительность возросла незначительно (41 % при специфичности 91 %), она практически не зависела от стадии, степени дифференцировки и подтипа РЛ [39, 41]. Сообщается, что чувствительность EarlyCDT-Lung для ранних стадий РЛ составляет около 40 %. Отмечается также, что у пациентов с НКРЛ чаще выявляются ААТ к MAGE-A4, а при мелкоклеточном РЛ – к онкофетальному антигену HuD и к SOX2 [39, 41]. Как показали J. Mathew и соавт., выявление ААТ с помощью данного теста не зависело от возраста, пола и этнической принадлежности обследуемых лиц [42].

В настоящее время в Шотландии проводится рандомизированное контролируемое исследование по оценке пригодности EarlyCDT-Lung в качестве скринингового теста для выявления лиц с высоким риском развития РЛ. В программу вошли 12 тыс. участников в возрасте 50–75 лет. Режим скрининга на 1-м этапе включает проведение EarlyCDT-Lung Test с последующими рентгенографией и компьютерной томографией (КТ) легких лиц с положительными результатами лабораторного анализа [40]. Итоги проекта будут подводиться спустя 24 мес после заключительного тестирования последнего участника проекта на основании таких показателей, как смертность от РЛ, экономическая эффективность и психологические последствия скрининга РЛ. Кроме этого, обследуемым лицам с положительным результатом теста, но без подтверждения диагноза РЛ по результатам КТ, будет предложено его повторное проведение с интервалом 6 мес в течение 2 лет. По мнению разработчиков скрининговой программы, по завершении можно будет оценить ее медицинскую эффективность [40].

J. Edelsberg и соавт. изучали вопрос, позволит ли введение ААТ-теста дополнительно к КТ-мониторингу 1000 пациентов с небольшими узловыми образованиями в легких и промежуточным риском РЛ улучшить результаты выявления злокачественного новообразования в легких в рентабельном режиме [43]. Для этого они использовали EarlyCDT-Lung Test, который был валидирован и доступен для использования в США через Клиническую лабораторию усовершенствованных дополнений (Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA) [17, 39, 43]. Авторы показали, что EarlyCDT-Lung Test способен идентифицировать



случаи РЛ с точностью 92 %, имеет чувствительность 41 % для всех стадий и гистологических типов при специфичности 93 % [39, 43]. По их мнению, положительный результат ААТ-теста с высокой вероятностью может свидетельствовать о злокачественном характере узлового образования в легких. Кроме этого, при использовании такой ААТ-стратегии для выявления РЛ удалось достичь смещения в сторону локализованных форм на 10,8 % (73,6 % локализованных случаев РЛ при КТ-наблюдении против 84,4 % при ААТ-тестировании). При этом у 63 обследуемых результаты EarlyCDT-Lung Test оказались ложноположительными. Тем не менее авторы сделали вывод о том, что поскольку тест является рентабельным и менее дорогим, чем ПЭТ-КТ (позитронно-эмиссионная томография), его применение в рамках стандартного КТ-контроля пациентов с узловыми образованиями в легких и промежуточным риском рака позволит, вероятно, увеличить продолжительность жизни больных РЛ за счет выявления большей доли ранних стадий процесса [43].

K. S. Anderson и соавт. еще в 2010 г. показали, что чувствительность теста выявления в сыворотке крови больных серозным РЯ ААТ к p53 составляет 41,79 % и только 13,3 % для РЯ других гистологических типов при высокой специфичности относительно здоровых женщин (91,7 %) и пациенток с доброкачественными образованиями яичников (90,0 %) [18]. Однако сравнение диагностических показателей ААТ к p53 с маркерами выбора РЯ – СА125 и HE4 – продемонстрировало преимущество последних (AUC 0,69; 0,99 и 0,98 соответственно). Затем авторы выясняли вопрос, возможно ли с помощью ААТ к p53 улучшить выявление серозного РЯ у больных с низкими или умеренными уровнями СА125. Для этого концентрации ААТ к p53 определили в 2 подобранных по возрасту и стадии группах первичных пациенток: с высокими ( $n = 20$ ) и относительно низкими ( $n = 20$ ) уровнями СА125 (медиана СА125–2116 и 40 ед/мл соответственно). Оказалось, что ААТ p53 присутствовали в 6/20 (30 %) сывороток больных РЯ с относительно низкими уровнями СА125 (3 пациентки имели I/II стадии и 3 – III/IV стадии процесса) и в 11/20 (55 %) наблюдений с высокими уровнями СА125. Авторы отмечают, что нельзя сделать заключения, что ААТ к p53 дают значимую дополнительную (к СА125 и HE4) информацию для улучшения дифференциальной диагностики рака и доброкачественных образований яичников в связи с преобладанием в исследуемой когорте больных случаев с распространенными формами рака [18]. С другой стороны, они полагают, что наличие ААТ к p53 в 30 % наблюдений с относительно низкими уровнями СА125 позволяет все же рассматривать их как перспективный биомаркер для дальнейшего изучения [18]. Так, в модели ( $n = 60$ ), скорректированной на возраст, продолжительность заболевания, платиносодержащую химиотерапию и количество ее циклов, а также стадию, авторы обнаружили корреляцию наличия p53-ААТ

с существенно лучшей выживаемостью больных серозным РЯ (hazard ratio 0,57; 95 % доверительный интервал 0,33–0,97;  $p = 0,04$ ). По мнению исследователей, этот показатель можно рассматривать как дополнительный независимый прогностический фактор [18]. Авторы не обсуждают причины такой ассоциации ААТ с лучшим прогнозом. Действительно, в настоящее время роль ААТ до конца не известна и, вероятно, можно говорить лишь о том, что их наличие отражает одну из реакций организма на развитие опухолевого процесса [3]. Однако нельзя исключить, что установленная корреляция ААТ с лучшим прогнозом у части больных может свидетельствовать о попытках организма ингибировать рост опухолевых клеток посредством активации гуморального звена противоопухолевого иммунитета.

Позднее исследователи создали и протестировали диагностическую панель для выявления ААТ к 12 ОААГ, из которых отобрали 3 (p53, PTGFR и РТПРА). PTGFR (FR) – поверхностный рецептор простагландина E, который запускает каскад лютеолиза желтого тела. Стимуляция этого рецептора активирует сигнальный путь MAPK (mitogen-activated protein kinase). Белок РТПРА – поверхностная тирозинфосфатаза, он вовлечен в сигнальный путь ERK2 (активация Т-клеток, пролиферация эндотелиальных клеток при ангиогенезе и т. д.) [8].

Тест, выявляющий ААТ к p53, PTGFR и РТПРА, отличался лучшей чувствительностью в обнаружении РЯ (21,7; 21,7 и 31,7 % соответственно) при 95 % специфичности и AUC 0,65. Когда же тест расценивался как положительный при повышенных уровнях 2 из 3 ААТ, чувствительность значимо не увеличивалась (23,3 %), но существенно возрастала его специфичность (98,3 %) [8].

При серозном РЯ повышенные уровни хотя бы 1 из 3 ААТ (к p53, PTGFR или РТПРА) выявлены в 45 % (27/60) наблюдений и только у 8/60 подобранных по возрасту здоровых женщин. Кроме этого, провели сравнительный анализ уровней каждого из этих 3 ААТ у 30 больных серозным РЯ и 30 подобранных по возрасту пациенток с неонкологическими заболеваниями яичников (19 – серозные цистоаденомы и 11 – муцинозные цистоаденомы). Чувствительность и AUC составили: для ААТ к p53 – 53,3 % и 0,86 соответственно; для ААТ к PTGFR – 16,7 % и 0,57; для РТПРА – 13,3 % и 0,61 при специфичности каждого из них 93,3 % [8].

В 2011 г. K. S. Anderson и соавт. провели скрининг 4988 маркеров-кандидатов в ОААГ, на которые вырабатываются ААТ у больных РМЖ [44]. В итоге были отобраны 28 антигенов (ATP6AP1, PDCD6IP, DBT, CSNK1E, FRS3, RAC3, HOXD1, SF3A1, STBP16, C15orf48, MYOZ2, EIF3E, BAT4 ATF3, BMX, RAB5A, UBAP1, SOX2, GPR157, BDNF, ZMYM6, SLC33A1, TRIM32, ALG10, TFCP2, SERPINH1, SELL, ZNF510). Для ААТ к этим ОААГ использовали дискриминационные уровни, при которых достигается специфичность ~95 % (55–100 %) в обучающей выборке. Чувствительность

каждого биомаркера (ААТ) колебалась от 11,76 до 39,22 %, а специфичность относительно группы пациенток с доброкачественными образованиями в молочной железе превышала 91 %. При валидации метода чувствительность каждого ААТ колебалась от 11,76 до 42,0 %, а у 25/28 биомаркеров специфичность превышала 80 %. В итоге был создан алгоритм («классификатор») с чувствительностью метода 80,8 % для РМЖ при специфичности 61,6 % (AUC 0,756), который авторы оценивают как потенциально полезный для раннего выявления данного заболевания [44].

В 2017 г. Y. Liu и соавт. осуществили ROC-анализ 4 ААТ к белкам p16, с-МЫС, TP53 и ANXA-1, а также панели из этих антител, чтобы оценить их диагностическую значимость для РМЖ [45]. Чувствительность панели для больных РМЖ в целом, группы с I/II и с III/IV стадиями заболевания составила 33,3; 31,6 и 33,3 % соответственно, т.е. диагностическая панель указанных ААТ обладала сходной чувствительностью у больных РМЖ разных стадий.

В целях разработки диагностического алгоритма для РМЖ в настоящее время группой L. Bassaro и соавт. проводится испытание панели из 30 ААТ. Наиболее перспективными (по предварительным данным) представляются ААТ против интерлейкина 29, остеопротегерина (белок, угнетающий процесс костной резорбции),

сурвивина, гормона роста и резистина (полипептид, секретируемый адипоцитами) [7].

Таким образом, установленные факты продукции и накопления в сыворотке крови ААТ к собственным белкам, претерпевшим те или иные изменения в процессе злокачественной трансформации, т.е. ОААГ, являются теоретически обоснованными для разработки новых лабораторных алгоритмов диагностики и прогноза течения злокачественных заболеваний. Мишенями большинства сывороточных ААТ, обнаруженных у онкологических больных, служат белки, вовлеченные в разные этапы канцерогенеза

Кроме этого, изучение основных причин появления ААТ может дать большее понимание механизмов возникновения иммуногенности аутологических белков в процессе злокачественной трансформации тканей и ее изменения при развитии опухолевого процесса. Идентификация и характеристика ААТ как иммунологических «репортеров», ассоциированных с канцерогенезом, могут также внести вклад в понимание ранних этапов канцерогенеза. Такие исследования, по мнению P. Zaenker и соавт., важны не только для разработки новых лабораторных тестов, но и для поиска эффективных терапевтических мишеней [15].

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Pedersen J.W., Wandall H.H. Autoantibodies as biomarkers in cancer. *Labmedicine* 2011;42(10):623–8. DOI: 10.1309/LM2T3OU3RZRTKSN. PMID: 19860826
2. Tan H.T., Low J., Lim S.G., Chung M.C. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J* 2009; 276(23):6880–904. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07396.x. PMID: 19860826
3. Macdonald I.K., Parsy-Kowalska C.B., Chapman C.J. Autoantibodies: opportunities for early cancer detection. *Trends Cancer* 2017;3(3):198–213. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.02.003. PMID: 28718432.
4. Fortner R.T., Damms-Machado A., Kaaks R. Systematic review: tumor-associated antigen autoantibodies and ovarian cancer early detection. *Gynecol Oncol* 2017;147(2):465–80. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.07.138. PMID: 28800944.
5. Zhong L., Coe S.P., Stromberg A.J. et al. Profiling tumor-associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006;1(6):513–9. DOI: 10.1097/01243894-200607000-00003. PMID: 17409910.
6. Xu Y.W., Peng Y.H., Chen B. et al. Autoantibodies as potential biomarkers for the early detection of esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2014;109(1):36–45. DOI: 10.1038/ajg.2013.384. PMID: 24296751.
7. Bassaro L., Russell S.J., Pastwa E. et al. Screening for multiple autoantibodies in plasma of patients with breast cancer. *Cancer Genom Proteom* 2017;14(6):427–35. DOI: 10.21873/cgp.20052. PMID: 29109092.
8. Anderson K.S., Cramer D.W., Sibani S. et al. Autoantibody signature for the serologic detection of ovarian cancer. *J Proteom Res* 2015;14(1):578–86. DOI: 10.1021/pr500908n. PMID: 25365139.
9. Сергеева Н.С., Маршутина Н.В., Солохина М.П. и др. Современные представления о серологических опухолеассоциированных маркерах и их месте в онкологии. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;1(1):69–80. DOI: 10.17650/2313-805X.2014.1.1.69-80. [Sergeeva N.S., Marshutina N.V., Solokhina M.P. et al. Modern conceptions of serological tumor markers and their role in oncology. *Uspekhimiokulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2014;1(1):69–80. (In Russ.).]
10. Loke S.Y., Lee A.S.G. The future of blood-based biomarkers for the early detection of breast cancer. *Eur J Cancer* 2018;92:54–68. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.12.025. PMID: 29413690.
11. Moore R.G., Miller M.C., Disilvestro P. et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. *Obstet Gynecol* 2011;118(2 Pt 1):280–8. DOI: 10.1097/AOG.0b013e318224fce2. PMID: 21775843.
12. Lu K.H., Skates S., Hernandez M.A. et al. A 2-stage ovarian cancer screening strategy using the Risk of Ovarian Cancer Algorithm (ROCA) identifies early-stage incident cancers and demonstrates high positive predictive value. *Cancer* 2013;119(19):3454–61. DOI: 10.1002/cncr.28183. PMID: 23983047.
13. Каприн А.Д., Алексеев Б.Я., Сергеева Н.С. и др. Лабораторный индекс клинического стадирования — новый мультипараметрический показатель для рака предстательной железы. *Онкология. Журнал имени П.А. Герцена* 2016;5(1):23–30. [Kaprin A.D., Alekseev B.Ya., Sergeeva N.S. et al. Clinical staging laboratory index is a new multiparameter indicator for prostate cancer. *Onkologiya. Zhurnal imeni*

- P.A. Gertsena = P.A. Herzen Journal of Oncology 2016;5(1):23–30. (In Russ.).
14. Сергеева Н.С., Скачкова Т.Е., Алексеев Б.Я. и др. Индекс ВИЗГ – новый мультипараметрический показатель для рака предстательной железы. Онкоурология 2016;12(4):89–95. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-4-94-103. [Sergeeva N.S., Skachkova T.E., Alekseev B.Ya. et al. APHIG: a new multiparameter index for prostate cancer. Onkourologiya = Cancer Urology 2016;12(4):89–95. (In Russ.).]
  15. Zaenker P., Gray E.S., Ziman M.R. Autoantibody production in cancer – the humoral immune response toward autologous antigens in cancer patients. Autoimmun Rev 2016;15(5):477–83. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.01.017. PMID: 26827909.
  16. Zhang H.F., Qin J.J., Ren P.F. et al. A panel of autoantibodies against multiple tumor-associated antigens in the immunodiagnosis of esophageal squamous cell cancer. Cancer Immunol Immunother 2016;65(10):1233–42. DOI: 10.1007/s00262-016-1886-6. PMID: 27553002.
  17. Murray A., Chapman C.J., Healey G. et al. Technical validation of an autoantibody test for lung cancer. Ann Oncol 2010;21(8):1687–93. DOI: 10.1093/annonc/mdp606. PMID: 20124350.
  18. Anderson K.S., Wong J., Vitonis A. et al. p53 autoantibodies as potential detection and prognostic biomarkers in serous ovarian cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010;19(3):859–68. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0880. PMID: 20200435.
  19. Caron M., Choquet-Kastylevsky G., Joubert-Caron R. Cancer immunomics: using autoantibody signatures for biomarker discovery. Mol Cell Proteomics 2007;6(7):1115–22. DOI: 10.1074/mcp.r600016-mcp200. PMID: 17376768.
  20. Qiu J., Keyser B., Lin Z.T. et al. Autoantibodies as potential biomarkers in breast cancer. Biosensors (Basel) 2018;8(3):E67. DOI: 10.3390/bios8030067. PMID: 30011807.
  21. Chatterjee M., Mohapatra S., Ionan A. et al. Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays. Cancer Res 2006;66(2):1181–90. DOI: 10.1158/0008-5472.can-04-2962. PMID: 16424057.
  22. Houghton A.N., Gold J.S., Blachere N.E. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. Curr Opin Immunol 2001;13(2):134–40. DOI: 10.1016/s0952-7915(00)00195-3. PMID: 11228404.
  23. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология опухолевого роста. Проект «Наукова книга». Национальная академия наук Украины. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого. Киев: Наукова думка, 2005. 792 с. [Berezhnaya N.M., Chekhun V.F. Immunology of tumor growth. Project “Scientific book”. National Academy of Sciences of Ukraine. R.E. Kravetsky Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology. Kiev: Naukova dumka, 2005. 792 p.(InRuss.).]
  24. Stevenson B.J., Iseli C., Panji S. et al. Rapid evolution of cancer/testis genes on the X chromosome. BMC Genomics 2007;8:129–39. DOI: 10.1186/1471-2164-8-129. PMID: 17521433.
  25. Chatterjee M., Tainsky M.A. Non-traditional immunogens and their application to immunotherapy. Curr Opin Mol Ther 2008;10(1):62–7. PMID: 18228183.
  26. Hanash S. Harnessing immunity for cancer marker discovery. Nat Biotechnol 2003;21(1):37–8. DOI: 10.1038/nbt0103-37. PMID: 12511908.
  27. Suzuki H., Graziano D.F., McKolanis J. et al. T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease. Clin Cancer Res 2005;11(4):1521–6. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-04-0538. PMID: 15746055.
  28. Nesterova M., Johnson N., Cheadle C. et al. Autoantibody biomarker opens a new gateway for cancer diagnosis. Biochim Biophys Acta 2006;1762(4):398–403. DOI: 10.1016/j.bbdis.2005.12.010. PMID: 16483750.
  29. Scanlan M.J., Chen Y.T., Williamson B. et al. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. Int J Cancer 1998;76(5):652–8. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19980529)76:5<652::aid-ijc7>3.0.co;2-p. PMID: 9610721.
  30. Fernández Madrid F. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. Cancer Lett 2005;230(2):187–98. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.12.017. PMID: 16297705.
  31. Coronella-Wood J.A., Hersh E.M. Naturally occurring B-cell responses to breast cancer. Cancer Immunol Immunother 2003;52(12):715–38. DOI: 10.1007/s00262-003-0409-4. PMID: 16297705.
  32. Li Z. Role of heat shock protein in chaperoning tumor antigens and modulating anti-tumor immunity. Chapter In Book: Tumor Antigens Recognized by T Cells and Antibodies. Eds.: H. Stauss, Y. Kawakami, G. Parmiani. Taylor and Francis, NY, 2003. Pp. 20–33.
  33. Villanueva J., Shaffer D.R., Philip J. et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. J Clin Invest 2006;116(1):271–84. DOI: 10.1016/j.jci.2006.02.005. PMID: 16395409.
  34. Heo C.K., Bahk Y.Y., Cho E.W. Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarkers. BMB Reports 2012;45(12):677–85. DOI: 10.5483/BMBRep.2012.45.12.236. PMID: 23261052.
  35. Xu Y.W., Liu C.T., Huang X.Y. et al. Serum Autoantibodies against STIP1 as a potential biomarker in the diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. Disease Markers 2017;2017:5384091. DOI: 10.1155/2017/5384091. PMID: 28852266.
  36. Scanlan M.J., Gordan J.D., Williamson B. et al. Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. Int J Cancer 1999;83(4):456–64. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19991112)83:4<456::aid-ijc4>3.3.co;2-x. PMID: 10508479.
  37. Cho H., Kim S., Shin H.Y. et al. Expression of stress-induced phosphoprotein1 (STIP1) is associated with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. Genes Chromosomes Cancer 2014;53(4):277–88. DOI: 10.1002/gcc.22136. PMID: 10508479.
  38. Chao A., Lai C.H., Tsai C.L. et al. Tumor stress-induced phosphoprotein1 (STIP1) as a prognostic biomarker in ovarian cancer. PLoS One 2013;8(2):e57084. DOI: 10.1371/journal.pone.0057084. PMID: 23468915.
  39. Chapman C.J., Healey G.F., Murray A. et al. EarlyCDT® Lung test: improved clinical utility through additional autoantibody assays. Tumour Biology 2012;33(5):1319–26. DOI: 10.1007/s13277-012-0379-2. PMID: 22492236.
  40. Sullivan F.M., Farmer E., Mair F.S. et al. Detection in blood of autoantibodies to tumour antigens as a case-finding method in lung cancer using the EarlyCDT®-Lung Test (ECLS): study protocol for a randomized controlled trial. BMC Cancer 2017;17(1):187–97. DOI: 10.1186/s12885-017-3175-y. PMID: 28284200.
  41. Jett J.R., Healey G., Macdonald I. et al. Determination of the detection lead time for autoantibody markers in early stage lung cancer using the UKCTOCS cohort. J Thorac Oncol 2017;12(No.11S2):S2170.
  42. Mathew J., Healey G., Jewell W. et al. Demographics of populations at high risk of lung cancer and results of the Early CDT-Lung test. J Clin Oncol 2010;28(15):7033. DOI: 10.1200/jco.2010.28.15\_suppl.7033.

43. Edelsberg J., Weycker D., Atwood M. et al. Cost-effectiveness of an autoantibody test (EarlyCDT-Lung) as an aid to early diagnosis of lung cancer in patients with incidentally detected pulmonary nodules. *PLoS One* 2018;13(5):e0197826. DOI: 10.1371/journal.pone.0197826. PMID: 29787590.
44. Anderson K.S., Sibani S., Wallstrom G. et al. Protein microarray signature of autoantibody biomarkers for the early detection of breast cancer. *J Proteome Res* 2011;10(1):85–96. DOI: 10.1021/pr100686b. PMID: 20977275.
45. Liu Y., Liao Y., Xiang L. et al. A panel of autoantibodies as potential early diagnostic serum biomarkers in patients with breast cancer. *Int J Clin Oncol* 2017;22(2):291–6. DOI: 10.1007/s10147-016-1047-0. PMID: 27778118.

#### Вклад авторов

Н.В. Маршутина: идея, обзор публикаций по теме статьи, написание отдельных глав рукописи;

Н.С. Сергеева: обзор публикаций по теме статьи, написание отдельных глав рукописи, научное редактирование текста;

И.И. Алентов: написание отдельных глав рукописи, подготовка рукописи к публикации;

А.Д. Каприн: разработка дизайна обзора, научное редактирование.

#### Authors' contributions

N.V. Marshutina: idea, reviewing of publications of the article's theme, writing individual chapters of the manuscript;

N.S. Sergeeva: reviewing of publications of the article's theme, writing individual chapters of the manuscript, scientific text editing;

I.I. Alentov: writing individual chapters of the manuscript, manuscript preparation for publication;

A.D. Kaprin: developing the research design, scientific editing.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Н.В. Маршутина/N.V. Marshutina: <https://orcid.org/0000-0003-2997-4936>

Н.С. Сергеева/N.S. Sergeeva: <https://orcid.org/0000-0001-7406-9973>

И.И. Алентов/I.I. Alentov: <https://orcid.org/0000-0002-5920-5823>

А.Д. Каприн/A.D. Kaprin: <http://orcid.org/0000-0001-8784-8415>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Статья поступила:** 06.11.2018. **Принята к публикации:** 11.03.2019.

**Article received:** 06.11.2018. **Accepted for publication:** 11.03.2019.



# Модулирование образования активных форм азота ингредиентами растительных продуктов при ингибировании канцерогенеза

В.П. Дерягина<sup>1</sup>, В.П. Реутов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН»; Россия, 117485 Москва, ул. Бутлерова, 5а

**Контакты:** Валентина Петровна Дерягина derygina@inbox.ru

В обзоре анализируются данные литературы и результаты собственных исследований о роли активных форм азота ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ) в инициации и прогрессии опухолей. Анализируется возможность модуляции активности индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазы биологически активными компонентами растительных продуктов и их влияние на канцерогенез. Обсуждаются возможные механизмы неоднозначного действия  $\text{NO}$  и продуктов его метаболизма в канцерогенезе. Обобщение и анализ этих данных позволили сформулировать некоторые принципы применения веществ, модулирующих активность индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазы и влияющих на образование  $\text{NO}$  и продуктов его метаболизма при ингибировании канцерогенеза.

**Ключевые слова:** оксид азота, активные формы оксида азота, индуцибельная  $\text{NO}$ -синтаза, цикл оксида азота, канцерогенез, биологически активный компонент растительных продуктов

**Для цитирования:** Дерягина В.П., Реутов В.П. Модулирование образования активных форм азота ингредиентами растительных продуктов при ингибировании канцерогенеза. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(1):18–36.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-18-36

## Modulation of the formation of active forms of nitrogen by ingredients of plant products in the inhibition of carcinogenesis

V.P. Deryagina<sup>1</sup>, V.P. Reutov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences; 5a Butlerova St., Moscow 117485, Russia

The review analyzes literature data and the results of our own research on the role of reactive nitrogen species ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ) in the initiation and progression of tumors. The possibility of modulating the activity of inducible  $\text{NO}$  synthase by the biologically active components of plant products and their effect on carcinogenesis is analyzed. Possible mechanisms of the ambiguous action of  $\text{NO}$  and its metabolic products in the mechanisms of carcinogenesis are discussed. The generalization and analysis of these data allowed us to formulate some principles for the use of substances that modulate the activity of inducible  $\text{NO}$  synthase and affect the formation of  $\text{NO}$  and its metabolic products in inhibiting carcinogenesis.

**Key words:** nitric oxide, active forms of nitric oxide, inducible  $\text{NO}$ -synthase, cycle of nitric oxide, carcinogenesis, biologically active component of plant products

**For citation:** Deryagina V.P., Reutov V.P. Modulation of the formation of active forms of nitrogen by ingredients of plant products in the inhibition of carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):18–36.

### Введение

Оксид азота ( $\text{NO}$ ), продуцируемый  $\text{NO}$ -синтазами ( $\text{NOS}$ ), — свободный радикал, участвует в регуляции жизненно важных физиологических функций, в том числе вазодилатации, нейротрансмиссии, иммунных реакциях и др. При некоторых патологических состояниях, включая рак, наиболее часто регистрируют увеличение экспрессии одной из изоформ  $\text{NOS}$  —  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой индуцибельной  $\text{NOS}$  ( $\text{iNOS}$ ) [1]. Результаты клинических исследований показали, что экс-

прессия  $\text{iNOS}$  положительно коррелирует с прогрессией при опухолях легких, предстательной железы, молочной железы, мочевого пузыря, ротовой полости, пищевода, желудка и толстой кишки [2]. Высокие концентрации  $\text{NO}$ , достигающие микромолярных уровней, способствуют образованию активных форм  $\text{NO}$  ( $\text{A}\Phi\text{NO}$ ) —  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  и др., которые могут вызвать повреждение ДНК, активацию онкогенов, подавление активности репарирующих ДНК ферментов, химическую модификацию белков (содержащих

гем-, тиоловые, тирозиновые остатки или металлы переменной валентности и др.), а также оказывают цитостатическое и цитотоксическое действия на опухолевые клетки [3]. На протяжении нескольких лет NO рассматривалась в основном как онкогенная молекула, но в последние годы анализируются механизмы противоопухолевого действия NO с участием иммунных клеток в иницировании апоптоза и влияния на адгезионные свойства молекул.

В некоторых эпидемиологических исследованиях приведены убедительные доказательства наличия тесной обратной связи увеличения потребления овощей, фруктов, цельных злаков, бобовых, специй с риском развития онкологических заболеваний [4, 5]. Результаты экспериментальных исследований подтверждают, что многие биологически активные компоненты растительных продуктов (БАКРП): флавоноиды, фенольные кислоты, индолы, ретиноиды, витамины и др. — могут модулировать метаболизм ксенобиотиков, изменять активность ферментов, репарирующих ДНК, ингибировать клеточную пролиферацию, замедляя рост опухолей [5–7]. Можно ожидать, что эффекты БАКРП с присущим им антиоксидантным потенциалом затронут NO-сигнальные пути через прямое взаимодействие с NO и его активными формами, нивелируя их действие или через блокирование факторов, влияющих на образование NO: ядерного фактора  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), активатора белка 1 (AP-1) или митогенактивирующих протеинкиназ (МАРК) и др.

**Цель работы** — краткий обзор путей, модулирующих активность iNOS, а также анализ противоопухолевых эффектов БАКРП с позиции их влияния на экспрессию iNOS и другие факторы, задействованные в канцерогенезе.

### **Влияние экзогенных окислов азота и их солей на организм**

Окислы азота, нитраты (НА) и нитриты (НИ) — повсеместно распространенные соединения, участвующие в круговороте азота в биосфере, при поступлении в организм в количествах, существенно превышающих допустимые уровни, могут оказывать токсическое, мутагенное, иммуносупрессивное действия. Выбросы транспорта, промышленных предприятий, химизация сельского хозяйства являются основными причинами повышенной нагрузки этих соединений на человека [8, 9]. Окислы азота в случае длительного профессионального воздействия вызывают хронические заболевания органов дыхательной системы (пневмосклероз, бронхоэктазы, эмфизему легких и т. д.), на фоне которых могут возникнуть злокачественные новообразования [10].

При отравлении окислами азота в крови образуются НА и НИ, последние превращают оксигемоглобин в метгемоглобин. Поступившие с пищей или образовавшиеся эндогенно НИ могут быть предшественниками биосинтеза канцерогенных N-нитрозосоединений

[8, 11, 12]. В организме НИ могут восстанавливаться до NO с участием ксантиноксиредуктазы, аскорбиновой кислоты, полифенолов, а также в реакциях с гемоглобином (Hb), миоглобином, взаимодействуя с ферментами дыхательной цепи митохондрий и электронно-транспортной цепи эндоплазматического ретикулума. В реакции Hb с НИ промежуточными продуктами являются свободнорадикальные формы кислорода и азота:  $O_2^-$ , нитрозильный радикал ( $NO_2^{\cdot}$ ), которые могут оказывать повреждающее действие на клеточные структуры [9, 13]. В условиях кислых значений pH, часто регистрируемых в солидных опухолях, НИ могут восстановиться до NO и  $NO_2^{\cdot}$  [14]. В экспериментальных исследованиях, проведенных на трансплантируемой и автохтонной моделях опухолей, была подтверждена способность НИ модифицировать бластоогенез, индуцированный химическими, физическими и биологическими факторами. В подавляющем большинстве исследований наблюдали усиление канцерогенных эффектов в результате воздействия НИ [15–17].

### **Образование активных форм азота в организме человека и животных**

В настоящее время известно несколько механизмов образования активных форм азота в организме человека и животных: при участии конститутивных нейрональной, эндотелиальной NOS и индуцибельной NOS, а также в результате нитритредуктазной активности гемсодержащих белков (Hb, миоглобина, цитохромоксидазы (сyt a+a<sub>3</sub>), цитохрома P450 и при неферментативном превращении ионов  $NO_2^-$  при кислых значениях pH [18–21].

Конститутивные  $Ca^{2+}$ -зависимые нейрональная NOS (nNOS, 1-й тип) и эндотелиальная NOS (eNOS, 3-й тип), а также  $Ca^{2+}$ -независимая iNOS (2-й тип) синтезируют NO из гуанидинового азота L-аргинина в реакции с кислородом с участием коферментов NADPH, FAD, FMN, тетрагидриобиптерина [22, 23]. NO является необходимым и универсальным регулятором многочисленных физиологических процессов, выполняя ключевую роль в контроле тонуса сосудов, регуляции дыхания, иммунных реакциях, в механизмах нейротрансдукции и др. Биологические эффекты сигнальной молекулы NO обусловлены свойствами ее свободного радикала с про- и антиоксидантной активностью, малым размером, липофильностью, способностью к диффузии через мембраны, а также способностью к эндогенному образованию активных форм NO:  $NO^-$ ,  $NO^+$ ,  $NO_2$ ,  $N_2O_3$ ,  $N_2O_4$ ,  $ONOO^-$  (АФНО). При воспалениях, опухолевом росте и других патологических состояниях происходит индукция iNOS под влиянием интерлейкина  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), интерферона  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), бактериального липополисахарида (LPS), белков теплового шока и др. преимущественно в макрофагах, моноцитах, опухолевых, эпителиальных и других типах клеток [23]. В условиях гипоксии инфильтрирующие опухоль IFN-примированные



макрофаги содержат iNOS и могут синтезировать NO [24]. Гипоксия и IFN- $\gamma$  взаимно усиливали экспрессию iNOS в макрофагах за счет физического взаимодействия двух транскрипционных факторов: фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1), и IFN-регулирующего фактора 1 (IRF-1) [24].

Цитокины, индуцирующие iNOS через сигнальный каскад, могут вызвать изменение уровня экспрессии определенных генов в клетках-мишенях, конечным звеном каскада часто оказываются транскрипционные факторы. В экспрессию iNOS вовлечены многочисленные транскрипционные факторы, такие как NF- $\kappa$ B, AP-1, сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции 1 $\alpha$  (STAT-1 $\alpha$ ), IRF-1, NF-IL-6 и высокоподвижная группа I (Y) белка, HIF-1 и др. Следует добавить, что NO, продуцируемый iNOS, ингибирует активность самого фермента (обратная связь), тем самым осуществляется саморегуляция синтеза NO [22, 25–28].

Концентрации NO, продуцируемые iNOS, могут в 1000 раз и более превышать уровни NO, продуцируемые конститутивной eNOS ( $10^{-9}$ – $10^{-8}$  M) [29–31]. Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B играет ключевую роль в регуляции генов, участвующих в воспалительных и иммунных реакциях, включая iNOS. Полагают, что NF- $\kappa$ B является основной мишенью для активаторов и ингибиторов экспрессии iNOS [32, 33].

Конечными продуктами метаболизма NO являются ионы NO $_2^-$  и NO $_3^-$ . При гипоксии/ишемии, функциональной нагрузке или при переходе гемсодержащих белков в дезоксиформу ионы NO $_2^-$  легко превращаются в NO в крови и тканях человека и животных в цикле NO. NO может напрямую взаимодействовать с супероксидным анион-радикалом, минуя ферментативные и неферментативные системы. В ходе этих реакций образуются молекулы NO $_2$  и анионы пероксинитритов, которые после протонирования распадаются на высокорекреационные NO $_2$  и OH-радикалы, способные участвовать в цепных свободнорадикальных процессах и окислять/повреждать практически все биохимические структуры [34–36].

### Механизмы действия оксида азота

Рассматривают 2 пути, по которым реализуется NO-сигнализация. Один из них циклинзависимый, при котором NO реагирует с активным сайтом растворимой гуанилатциклазы (sGC) с образованием циклического гуанозинмонофосфата (сGMP). Последний активирует сGMP-зависимую протеинкиназу G (PKG), которая фосфорилирует многочисленные субстраты [37]. В общем увеличение сGMP ведет к вазорелаксации и снижению агрегации тромбоцитов [38].

Другой сигнальный путь гуанилатциклазонезависимый, при котором NO и его активные формы могут посттрансляционно нитрозировать, нитрозилировать или нитровать белки, содержащих гем-, тиоловые, тирозиновые остатки или металлы переменной валентности. При избыточном образовании NO и АФНО сти-

мулируются их реакции с белками, нуклеиновыми кислотами, липидами, свободнорадикальными соединениями, металлокомплексами, что приводит к нитрозированию (перенос иона нитрозония NO $^+$  к нуклеофильному центру), нитрозилированию (прямое включение NO (X-NO), где X-металл или радикальное соединение), нитрованию (X-NO $_2$ ), преимущественно, остатков тирозина, триптофана, а также жирных кислот и гуанозина [39]. Такие реакции могут оказать влияние на функцию белков, вызвать повреждение ДНК (дезаминирование его оснований, алкилирование, разрывы нитей) и др. [40]. S-нитрозилирование тиоловых групп серосодержащих аминокислот в составе критических для канцерогенеза белков может активировать или ингибировать опухолевый рост. Например, нитрозилирование специфических каспаз препятствует гибели опухолевых клеток; нитрозилирование белков, репарирующих ДНК, предотвращает репарирование окислительных аддуктов ДНК, тем самым способствует возникновению мутаций; нитрозилирование белка-супрессора опухолей PTEN вызывает обратимое ингибирование фосфатазной активности PTEN и может усилить PI3K/Akt/mTOR-сигнальный путь; S-нитрозилирование Bcl-2 ингибирует его протеосомную деградацию, предотвращая апоптоз, а также повышает резистентность эпителиальных клеток легких к аутофагии [41, 42].

### Участие оксида азота и его активных форм в канцерогенезе

NO и АФНО модулируют различные связанные с опухолевым процессом события: мутагенез, репарацию ДНК, пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, метастазирование и инвазию. NO активирует Ras-белки, нитрозируя SH-группы [43].

NO может как индуцировать, так и тормозить рост опухолей, выступая в последнем случае как соединение, перспективное в терапии опухолей [44]. Исследователи уделяют особое внимание роли iNOS в опухолевом процессе вследствие высокой продуктивности фермента в течение продолжительного времени (часы, дни) [29, 45, 46]. Полагают, что направленность физиологического ответа клетки существенно зависит от концентрации NO, которая может изменяться тысячекратно от nM до  $\mu$ M уровней. Наряду с этим продолжительность экспозиции NO и АФНО в клетке и межклеточном пространстве играет важную роль, так как отдельные белки по-разному реагируют в зависимости от этого показателя. Так, аккумуляция HIF-1 $\alpha$  в культуре клеток опухоли молочной железы MCF-7 наблюдается при длительной экспозиции NO, в то время как фосфорилирование ERK наблюдается при немедленном повышении концентрации NO и осуществляется через сGMP-механизм. Активированная форма p53 P-Ser-15 определялась с некоторой временной лагфазой после воздействия NO и сохранялась в течение нескольких часов после прекращения действия NO

(>300 nM). Необходимо добавить, что тип клеток, используемый источник NO могут существенно влиять на эти показатели [47]. Следует также отметить, что в клетке и межклеточном пространстве наблюдается высокий градиент концентраций NO, который обусловлен диффузионными свойствами и коротким полупериодом жизни молекулы (от 1 до 5 с *in vivo*), а также локализацией NO в определенных компартаментах (цитоплазма или мембрана) [3, 47]. Количество продуцируемого NO зависит от природы стимулов, активирующих NOS. При цитокиновой стимуляции клеток образуется меньше NO, чем при стимуляции липополисахаридами, которые активируют Toll-подобные рецепторы [48]. Другой механизм действия NO на p53 связан с накоплением p53 в клетке. Через механизм отрицательной обратной связи p53 уменьшает уровень активности iNOS [35]. Полагают, что при низких концентрациях (1–30 nM) NO может стимулировать пролиферацию, ангиогенез; высокие концентрации NO оказывают токсическое действие на опухолевые клетки. Однако даже при высоких концентрациях NO опухолевые клетки могут избежать гибели. Так, на примере гепатоцитов показано, что нитрозилирование каспазы 3 предотвращает апоптоз, инициированный TNF- $\alpha$ . NO ингибировал H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированный апоптоз в эндотелиальных клетках. При этом NO увеличивал активность протеасом и деградацию рецептора трансферрина путем убиквитинирования [49–51]. Эти примеры показывают, что клетки могут адаптироваться к условиям повышенного содержания NO и его производных, а химическая модификация молекул может скорректировать сигнальные пути, формируя защитные механизмы, предотвращающие гибель клеток.

Лишь ограниченное число работ посвящено оценке продукции NO и АФНО иммунными клетками в опухолях при их прогрессии. Показано, что продуцируемые макрофагами, нейтрофилами и другими иммунными клетками NO и АФНО оказывают цитотоксическое действие, могут запускать апоптотическую гибель опухолевых клеток, а также обладают антимикробным потенциалом против широкого спектра патогенов (в том числе *Helicobacter pylori*), но в некоторых случаях повышают резистентность опухоли к химиотерапии [24].

Роль iNOS в опухолях продолжает выясняться. Ученые сходятся во мнении, что необходимо проведение исследований с широкой направленностью, учитывающих взаимодействие клеток, экспрессирующих iNOS и другие изоформы NOS и чувствительных к действию NO: опухолевых, иммунных, эндотелиальных и эпителиальных клеток, опухолеассоциированных макрофагов, на разных стадиях опухолевого роста с учетом генеза опухоли.

### Низкомолекулярные ингибиторы iNOS

Регуляция эндогенного синтеза NO с помощью низкомолекулярных соединений является непростой

задачей. В зависимости от условий почти все типы клеток способны вырабатывать NO, но его уровни, продуцируемые опухолевыми, иммунными, эндотелиальными и эпителиальными клетками, наиболее существенны. По-видимому, при разработке ингибиторов целесообразно учитывать специфичность рецепторов, уникальных только для опухолевых клеток. На сегодняшний день получение селективных ингибиторов iNOS остается нерешенной проблемой. При поиске ингибиторов исследователи используют в основном следующие подходы:

- поиск соединений, способных не допускать поступление L-аргинина к активному центру фермента;
- синтез агентов, которые инактивируют кофакторы iNOS (антагонисты кальмодулина);
- поиск ингибиторов переноса электронов с NADPH на Fe (III);
- поиск соединений, разрушающих образующийся NO [52–54].

Кратко остановимся на результатах некоторых работ с применением ингибиторов NOS. На экспериментальных моделях опухолевого роста показано, что производные L-аргинина способны конкурентно вмешиваться в связывание субстрата и замедлять развитие опухолей [52, 54]. Помимо них, гуанидины, S-замещенные изотиомочевины и доноры NO (НИ, нитроэфиры, ноноаты, нитрамины и другие соединения, способные *in vitro* и *in vivo* высвобождать NO при их окислении, восстановлении или гидролитическом расщеплении) могут регулировать активность фермента и тормозить опухолевый рост [29, 55–58]. При биотрансформации доноров NO в организме высвобождается NO, который инактивирует фактор транскрипции NF- $\kappa$ B, снижая экспрессию контролируемого им гена *iNOS*. Известно, что экспрессия iNOS может положительно коррелировать с экспрессией COX-2 в опухолевых клетках, а усиление активности этих ферментов может играть важную роль в колоректальном канцерогенезе. Тестирование ингибитора COX-2 – ацетилсалициловой кислоты, в структуру которой входит фрагмент, способный осуществлять NO-донорную функцию (NCX 4016), выявило наличие противоопухолевого эффекта препарата на опухолевых клетках толстой кишки, легкого, поджелудочной, предстательной, молочной желез, а также на рост химически индуцированных опухолей поджелудочной железы и кишечника у животных. Противоопухолевое действие сопровождалось ингибированием пролиферации, индукцией апоптоза, ингибированием сигнальных путей Wnt, MAPK, Nrf2, NF- $\kappa$ B, а также iNOS [54, 55, 59]. Неоднозначные результаты получены при тестировании высокоселективного ингибитора iNOS – N-3-(аминометилбензил)ацетамидина (1400 W). Последний замедлял рост ксенографтов опухолей толстой кишки человека (DLD-1), ингибировал рост аденокарциномы молочной железы ЕМТ6 у мышей [60, 61]. Однако этот эффект отсутствовал при парентеральном росте клона

DLD-1 и подкожном введении клеток карциномы Эрлиха [60, 62].

Можно ожидать, что при активации iNOS, локализованной в макрофагах, фермент будет чувствителен к действию ингибиторов iNOS и это может повлиять на противоопухолевый потенциал иммунных клеток. Снижение функциональной активности клеток неспецифического иммунитета некоторыми авторами рассматривается как необходимое условие развития опухоли и метастазов [63]. Однако последние экспериментальные данные показывают, что NO, источником которого является iNOS в опухолеассоциированных макрофагах, способствует усилению резистентности опухоли к терапии цисплатином, и в этом случае подавление синтеза NO ингибиторами, возможно, улучшит результаты химиотерапии [64]. Следует указать на побочные эффекты при использовании малоселективных ингибиторов iNOS, которые могут изменять активность других изоформ NOS — эндотелиальной и нейрональной, нарушая их жизненно важные функции [52].

#### **Биологически активные компоненты растительных продуктов, модулирующие экспрессию iNOS**

Население, проживающее в Средиземноморском регионе, имеет более низкие показатели заболеваемости раком по сравнению с жителями Северной Европы или США, вероятно, вследствие более здоровых привычек в питании. В США на долю причин, связанных с особенностями питания, относят 30–35 % смертей, вызванных онкологическими заболеваниями [65]. Употребление овощей, фруктов снижает риск возникновения рака ряда нозологий [65]. Многие БАКРП с выраженными антиоксидантными свойствами могут инактивировать активные формы кислорода и АФНО, препятствуя свободнорадикальным цепным реакциям. БАКРП могут влиять на активность как iNOS, так и факторов, вовлеченных в активацию iNOS: NF-κB, AP-1, MAPK, цитокинов и др. БАКРП способны также изменять биотрансформацию канцерогенов, влиять на репарацию ДНК, экспрессию протоонкогенов, пролиферацию и дифференцировку клеток, апоптоз, эндокринный статус организма, систему противоопухолевого иммунитета и др. [6, 66, 67]. Растительные полифенолы препятствуют прогрессированию канцерогенеза, в том числе за счет избирательного взаимодействия с белками, образуя полифенольно-белковые комплексы, которые могут влиять на активность онкогенных белков-мишеней. Следует отметить, что в некоторых случаях, особенно при высоких дозах, БАКРП могут инициировать воспаление, повреждение ДНК и оказывать другие побочные эффекты [66, 68].

Рассмотрим на некоторых примерах противоопухолевые эффекты БАКРП и пищевых продуктов с позиции их влияния на эндогенный синтез NO и его производных, а также на экспрессию iNOS, ответственную за гиперпродукцию NO.

Экспериментальные и эпидемиологические данные подтверждают, что полифенол **ресвератрол (фитоалексин – 3,4',5-тригидрокси-транс-стильбен)** и его производные, присутствующие в винограде, оказывают защитный эффект при сердечно-сосудистых, нейродегенеративных процессах и опухолях [67]. В экспериментальных условиях ресвератрол разнонаправленно действовал на функцию iNOS в зависимости от типа опухолевых клеток. В тканях нейроэпителиальных опухолей головного мозга (астроцитомы, олигодендроглиомы, глиомы) обнаружены все 3 изоформы NOS, причем экспрессия iNOS может быть значительной [69]. В культуре клеток астроглиомы С6 крыс, предварительно обработанных β-амилоидом, ресвератрол дозозависимо снижал образование NO и экспрессию iNOS, но добавление его в среду клеток аденокарциномы желудка (SNU-1), наоборот, стимулировало в них активность NOS, подавляя синтез ДНК в опухолевых клетках [70, 71]. Активирующее действие ресвератрола на экспрессию iNOS и eNOS было зарегистрировано в культуре опухолевых клеток печени HepG2 [72]. Одновременно ресвератрол ингибировал пролиферацию опухолевых клеток печени, индуцируя апоптоз. Исследование влияния транс-ресвератрола и полифенолов, выделенных из виноградной лозы, содержащих транс-ресвератрол (vineatrol), на пролиферацию и выживаемость лейкоэмических лимфоцитов человека показало замедление пролиферации и усиление апоптоза в опухолевых клетках. Механизм действия полифенолов связывают с подавлением активности Bcl-2, активацией каспазы 3, а также со снижением экспрессии iNOS. Подчеркивается низкая токсичность высоких концентраций полифенолов по отношению к нормальным периферическим моноцитам, служащим контролем [73].

Получены данные о высокой эффективности внутривенного введения мышам диметилированного аналога ресвератрола — **птеростильбена**, который ингибировал метастазирование клеток меланомы B16M-F10 в легкие. В эксперименте на крысах F344 с пренеопластическими изменениями толстого кишечника, индуцированными азоксиметаном, введение в диету крыс птеростильбена снижало на 57 % число очагов без проявления токсичности. Показано, что птеростильбен способен подавлять пролиферацию клеток и экспрессию провоспалительных генов, в том числе *iNOS*. К потенциальными молекулярным мишеням ресвератрола и птеростильбенов можно отнести NF-κB, активирующий белок 1, STAT-3, Akt, Bcl-2, каспазы, митогенактивирующие протеинкиназы и 5-липоксигеназы [74].

**Синтезированные флавоны** также проявляли биологическую активность, в частности **диаминометоксифлавоны** индуцировал апоптоз и снижение активности iNOS в культуре опухолевых клеток, полученных от больных хроническим лимфолейкозом [75].

Интенсивно исследуется защитная роль в канцерогенезе ингредиента зеленого чая, флавоноида —

эпигаллокатехин-3-галлата (ЭГКГ). Продолжительное и регулярное употребление зеленого чая может снизить риск развития злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта. ЭГКГ ингибировал экспрессию iNOS и nNOS, VEGF, металлопротеиназу матрикса, EGFR, регуляторных белков клеточного цикла и другие сигнальные пути, вовлеченные в процесс индукции и развития опухолей [75–77].

Растительный флавоноид, содержащийся в сельдерее, красном сладком перце, траве пустырника и др., — **апигенин (4',5,7-триоксифлавонон)**, антиоксидант, тормозил рост опухолей различных локализаций, включая легкие, предстательную, поджелудочную и щитовидную железы, толстую кишку, кожу; опухоли головы и шеи и др., действуя на многие критические белки и онкогенные сигнальные пути. На культуре андроген-нечувствительных опухолевых клеток предстательной железы апигенин инициировал апоптоз, ингибировал NF-κB и экспрессию генов, контролируемых NF-κB: *Bcl-2*, *циклина D1*, *COX-2*, *iNOS* и *VEGF* [78, 79]. Апигенин способен усиливать цитотоксический эффект 5-фторурацила через ингибирование лекарственной резистентности и активацию апоптоза [79].

**Нобилетин** — полиметоксифлавоноид, обнаруженный в цитрусовых, является одним из эффективных ингибиторов роста опухолевых клеток в системе *in vitro* и экспериментах на животных [80]. Предварительная обработка кожи биофлавоноидом нобилетином и **куркумином** (пигмент, получаемый из корня куркумы, семейства имбирных) снижала образование опухолей кожи, индуцированных пероксинитритом совместно с промотором 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом (ТФА), приводила к супрессивному эффекту в отношении iNOS. Авторы подчеркивают, что комбинация каротиноидов и флавоноидов может быть более эффективной в профилактике опухолей кожи, чем отдельно взятые соединения [81].

Анализ эпидемиологических исследований показал статистически значимую связь потребления сои со снижением риска рака предстательной железы у мужчин. Экспериментально подтверждено, что содержащийся в сое **генистеин**, изофлавоноид, имеет антиканцерогенный потенциал [82, 83]. Внесение генистеина в культуры клеток астроцитов и клеток глиомы С6 дозозависимо ингибировало липополисахарид-, цитокин- и хлорохининдуцированную активность iNOS. Показано, что даже предварительной инкубации клеток совместно с генистеином бывает достаточно для подавления активности iNOS [84].

Фенолкарбоновые кислоты, к которым относят **галловую (ГК) и таниновую (ТК)**, обладают антиоксидантными свойствами, легко взаимодействуют со свободными радикалами. В серии экспериментов на клеточных линиях карциномы пищевода ГК продемонстрировала значимое ингибирование клеточной пролиферации и индуцировала апоптоз в злокачественных, но не в здоровых клетках, снижая активность

антиапоптотических белков Bcl-2 и Xiap [85]. Антиканцерогенная активность ГК была показана на различных опухолевых клетках: желудка, толстой кишки, предстательной и молочной желез, лейкозов и др. [86]. ГК и ТК при пероральном введении мышам увеличивали латентный период формирования опухолевых узлов и задерживали опухолевый рост на 91 и 78 % соответственно у животных с подкожно перевитой карциномой Эрлиха, разнонаправленно действуя на эндогенное образование производных NO [87].

**Ксантогумол** — халкон, полученный из хмеля. Он является ловушкой реактивных форм кислорода, включая гидроксил-, перокси-,  $O_2^-$ -радикалы, ингибирует образование NO, проявляет противовоспалительные свойства, ингибирует COX-1 и COX-2, а также оказывает противоэстрогенное действие, не обладая эстрогенным потенциалом. Экспериментально доказано, что ксантогумол может ингибировать клеточный рост и индуцировать апоптоз в опухолевых клетках молочной, предстательной желез, толстой кишки и лейкоцитарных клетках у человека [88]. Показано, что ксантогумол ингибировал синтез ДНК, пролиферацию, индуцируя арест клеточного цикла в фазах G0/G1 и S, апоптоз, вызывая снижение активации Notch-сигнального пути и др. [89].

**Ликопин** известен как пищевой краситель, но как микронутриент исследуется недавно. Этот ациклический каротиноид обладает антиоксидантными свойствами, способен гасить свободные радикалы, не синтезируется эндогенно, поступает в организм преимущественно с томатами [90]. Повышенное внимание к его биологическому действию связывают с полученными результатами, подтверждающими его антиканцерогенный потенциал и снижение риска развития опухолей предстательной, молочной желез, яичников и др. Так, введение диаллилдисульфида, ликопина и флавинов вызвало снижение соответственно на 43,6; 57,4 и 66,1 % числа очагов с пренеопластическими изменениями, индуцированных азоксиметаном, в толстой кишке у крыс. Выраженность защитного эффекта этих соединений коррелировала с выраженностью ингибирования iNOS и циклооксигеназы 2. Ликопин снижал число пролиферирующих опухолевых клеток яичников, инициировал апоптоз, ингибировал внутрибрюшинное метастазирование, модулируя экспрессию многих генов, вовлеченных в онкогенный сигналинг [91].

Особое внимание исследователей привлекают соединения, регулирующие несколько сигнальных путей, значимых для канцерогенеза. К ним относят **лулеол** — тритерпен, микронутриент многих фруктов и растений: манго, инжира, винограда, оливок, капусты и др. Проявляя низкую токсичность, лулеол ингибирует канцерогенез в системах *in vitro* и *in vivo*. Показан его противоопухолевый потенциал при раке предстательной, поджелудочной желез, кожи, гепатоцеллюлярной карциноме и др. На модели кожного канцерогенеза обнаружено, что предшествующая воздействию



7,12-диметилбенз(а)антрацена (ДМБА) и промотора ТФА аппликация лупеола ингибировала инициацию и промоцию опухолевого процесса. Нанесение на кожу канцерогена индуцировало появление по 7–8 опухолей у каждой мыши, но аппликация лупеола снижала число мышей с опухолями до 53 % при показателе множественности от 1 до 3 опухолей. Лупеол – мультитаргетное соединение, действующее на ключевые молекулы и сигнальные пути: NF-κB, iNOS, орнитин декарбоксилазу, COX-2, cFLIP, Fas, Kras, а также PI3K/Akt и Wnt/катенин и другие сигнальные пути [92–94].

**Индол-3-карбинол (ИЗК)** входит в состав овощей семейства крестоцветных (капуста, редис, репа, брюква). Результаты эпидемиологических исследований подтвердили взаимосвязь между высоким потреблением овощей, содержащих ИЗК, и снижением риска развития рака [95]. Многочисленные исследования на клеточных культурах молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, эндометрия показали супрессивный эффект ИЗК и его производных на пролиферацию опухолевых клеток. Кроме этого, ИЗК ингибировал спонтанный или химически индуцированный канцерогенез на моделях молочной железы, легких, печени, шейки матки и желудочно-кишечного тракта у животных. Противоопухолевые эффекты ИЗК связывают с избытком сигнальных путей, которые могут модулироваться под влиянием ИЗК, в том числе контролирующих апоптоз, клеточный цикл, гормональный гомеостаз, репарацию ДНК, ангиогенез, множественную лекарственную резистентность и др. [95, 96]. Влияния ИЗК на эндогенное образование метаболитов NO у мышей с перевиваемой карциномой Эрлиха не выявлено [97].

**Ретиноиды** структурно связаны с витамином А, или ретинолом – жирорастворимым спиртом. Основным источником витамина А являются каротиноиды, содержащиеся во фруктах, овощах, а также эфиры ретинила в животных продуктах (например, в печени). Показано, что витамин А, а также его синтетические и природные аналоги крайне важны для пролиферации и дифференцировки клеток, эмбрионального морфогенеза. Некоторые из них нашли применение в терапии острого промиелоцитарного лейкоза [98].

К настоящему времени из более 4000 исследованных ретиноидов стадии клинического применения достигли лишь несколько соединений, проявивших противоопухолевый эффект. Среди них **N-(4-гидроксибензил)ретинамид (N-ГФРА)**. Введение его крысам снижало экспрессию генов *iNOS*, *c-myc* и *cyclin D1* в опухолевых клетках и клетках печени с пренеопластическими изменениями, а также частоту и множественность опухолей у крыс [99]. Транс-ретиноевая кислота снижала экспрессию *iNOS* и TNF-α в культуре клеток слизистой оболочки ободочной кишки больных язвенным колитом и раком, ассоциированным с колитом [100]. На клеточных линиях опухолей мо-

лочной железы MDA-MB-231 и F10 получены другие результаты, свидетельствующие об отсутствии способности N-ГФРА влиять на образование NO либо дозозависимо стимулировать образование избыточных количеств NO. Доноры NO ингибировали рост и инвазивность метастазирующих в кости опухолевых клеток молочной железы. Авторы указывают на имеющийся потенциал N-ГФРА и NO в качестве превентивных соединений [101].

**Эйкозопентаеновая (ЭПК) и докозагексаеновая (ДГК) кислоты**, относящиеся к омега-3-полиненасыщенным жирным кислотам (ПНЖК), практически не синтезируются в организме и необходимы для нормального роста, развития мозга, нервов и др. Омега-3- и омега-6-ПНЖК являются предшественниками простагландинов, простациклинов, тромбоксанов и лейкотриенов. Как компоненты фосфолипидов клеточных мембран омега-6-, омега-3-ПНЖК модулируют клеточный сигналинг, взаимодействие клеток и текучесть мембран. ЭПК и ДГК проявляют многочисленные антиканцерогенные эффекты [102, 103]. При прогрессировании рака кишечника NO, продуцируемый в избыточных количествах, активирует COX-2, что приводит к увеличению продукции PGE<sub>2</sub>, и стимулирует неоангиогенез [104]. ЭПК и ДГК подавляют образование NO макрофагами и снижают синтез NO и активность NF-κB в опухолевых клетках толстой кишки [105, 106]. Действие малых доз ДГК и **1,4-фенил-бис-(метилена)-селеноцианата** эффективно ингибировало клеточный рост, экспрессию COX-2, iNOS, NF-κB и β-катенина в культуре опухолевых клеток CaCo-2. Уместно добавить о способности омега-3-ПНЖК в комбинации с цитотоксическими соединениями усиливать ингибирующий эффект препаратов на рост опухолей [107, 108].

Витамины, прежде всего проявляющие антиоксидантные свойства (**витамин Е, каротиноиды, витамин С** и др.), модулируют канцерогенез и биосинтез NO у животных [109, 110]. **Витамин Е** объединяет группу соединений производных токола, из которых токоферолы и токотриенолы проявляют выраженную антиоксидантную активность, которая препятствует повреждению клеточных структур свободными радикалами. Витамин Е участвует в биосинтезе гема, гормонов и др. Введение витамина Е (α-токоферол) ингибировало гепатоканцерогенез у трансгенных мышей с коэкспрессией *c-Myc* и трансформирующего ростового фактора (TGF), ответственных за хронический оксидативный стресс. При этом витамин Е подавлял в печени мышей повышенную экспрессию iNOS, уровни нитротирозина, белков теплового шока и белков HO-1 [111].

**Витамин С** (аскорбиновая кислота, или аскорбат натрия) – антиоксидант, но при высоких дозах – прооксидант, кофактор различных ферментов, участвующих в синтезе коллагена, карнитина, катехоламинов, кортикостероидов; инактивирует радикальную форму α-токоферола и др. [112]. Существенный дефицит

аскорбиновой кислоты был обнаружен у больных раком [113]. Частично это связано с воспалением и окислительными стрессами, истощающими резервы аскорбиновой кислоты. На фоне введенного аскорбата активность и экспрессия белка iNOS в эндотелии сосудов скелетных мышц снижались у мышей с сепсисом [114]. Аскорбиновая кислота в отношении eNOS, наоборот, может стимулировать ее активность, предположительно увеличивая биодоступность тетрагидробиоптерина и индуцируя высвобождение NO из S-нитрозотиолов плазмы [115]. В ряде работ выявлена терапевтическая активность высоких доз витамина С у больных на поздних стадиях онкологического заболевания [116]. В условиях хронического воспаления или инфицирования избыточная продукция NO и АФНО может способствовать протеканию реакций нитрозирования различных биологических мишеней с образованием потенциальных канцерогенных N-НС, ведущих к злокачественной трансформации клеток [1]. Уже в самых ранних работах обнаружена высокая ингибирующая активность аскорбиновой кислоты, блокирующая до 90 % образования N-НС из предшественников в организме [1, 117]. Способность ингибировать нитрозирование морфолина и пиперазина выявлена также у глутатиона, ТК (входит в состав чая), сульфида натрия (консервант), фолиевой кислоты, токоферолов, полифенолов и у некоторых пищевых продуктов, которые могут оказывать влияние на pH среды желудка, время пребывания в желудке предшественников и др. [118]. В наших работах показана превентивная активность соединений селена (Se) в отношении эндогенного синтеза N-НС. Se в виде селенметионина при концентрации Se в корме 1,5 мг/кг снижал в 2,8–5,1 раза синтез нитрозаминов в желудке крыс из введенных предшественников нитрита натрия в комбинации с диэтиламином, амидопирином или пролином соответственно [119, 120]. Защитная роль микроэлемента, по-видимому, связана с усилением антиоксидантной глутатионовой системы, в состав которой он входит.

Эпидемиологическими исследованиями установлена положительная связь частоты рака прямой кишки с количеством потребляемого красного мяса. Потребление мяса сопровождается увеличением уровня нитрогенных метаболитов – аминов и амидов, образующихся при бактериальном декарбоксилировании аминокислот в толстой и прямой кишке. Нитрозирование аминов и амидов способствует образованию N-НС. В серии исследований S.A. Bingham и соавт. на добровольцах-мужчинах показано, что содержание N-НС в кале дозозависимо нарастало с увеличением потребления красного мяса и не снижалось под действием источников пищевых волокон (отрубей, овощей и резистентных форм крахмалов), хотя время транзита при этом существенно сокращалось, что предполагает снижение контакта со слизистой оболочкой кишечника [121, 122]. Образование аддукта ДНК (O(6)-карбоксиметилгуанина) в эпителиальных клетках тол-

стого кишечника добровольцев, потреблявших красное мясо, коррелировало с суммарным уровнем N-НС в кале и было значительно выше, чем у добровольцев-вегетарианцев. Потребление сои снижало содержание N-НС в кале [123, 124]. При скармливании хот-догов (по составу близки к сосискам) мышам и крысам зарегистрирована активация нитрозирования по всей длине желудочно-кишечного тракта [125]. Бобовые, соленая рыба, ферментированные соевые продукты, плесневелые пищевые продукты способствуют образованию генотоксичных соединений в желудке, стимулируя реакции нитрозирования в присутствии НИ [126]. Эти данные служат основанием, чтобы рекомендовать ограничение потребления таких продуктов.

На основании гигиенического анализа выявленных закономерностей образования и накопления в пищевых продуктах канцерогенных нитрозосоединений был обоснован, разработан и внедрен в народное хозяйство нашей страны комплекс профилактических мероприятий, включающих рекомендации по изменению условий технологической обработки продукции с использованием ингибиторов нитрозирования, в том числе аскорбиновой кислоты, витаминов и др. [127].

Результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют о наличии обратной связи поступления **витамина В<sub>6</sub> (пиридоксина)** с риском рака кишечника [128, 129]. Известно, что коферментные формы витамина принимают участие в синтезе ДНК, метилировании и других процессах. Пиридоксин при поступлении с рационом (7, 14 или 36 мг/кг рациона) значительно снижал частоту и множественность опухолей толстой кишки, индуцированных азоксиметаном у мышей, подавляя клеточную пролиферацию, ангиогенез, оксидативный стресс и продукцию NO [130].

**Никотинамид – амидная форма витамина В<sub>3</sub> (ниацина)** – в составе NAD<sup>++</sup> участвует в окислительно-восстановительных реакциях, синтезе жирных кислот, холестерина, стероидов, поддержании целостности генома и др. и является компонентом косубстрата NADPH, необходимого для синтеза NOS [23, 25]. В условиях *in vitro* никотинамид выраженно снижал продукцию NO в культуре эндокринных клеток поджелудочной железы человека или мышинных макрофагов частично восстанавливая инсулиновую функцию клеток железы [130]. Однако у крыс никотинамид повышает радиочувствительность щитовидной железы к йоду-131 за счет усиления экспрессии eNOS, увеличения кровотока и повреждения ткани органическими пероксидами [131].

**N-ацетилцистеин и S-метилцистеин** – серосодержащие органические соединения с доказанной антипролиферативной и антиканцерогенной активностью, механизм которой связывают со способностью их реактивных SH-групп связываться с окислительными радикалами, нейтрализуя их [132]. N-ацетилцистеин, S-метилцистеин, S-аллилцистеин и диаллилсульфид относят к активным компонентам чеснока. Показано,



что под воздействием N-ацетилцистеина и S-метилцистеина дозозависимо снижалось число химически индуцированных пренеопластических очагов в печени крыс на фоне снижения экспрессии матричной РНК iNOS и IGF1 [133]. Защитное действие N-ацетилцистеина при действии высокой дозы НИ проявлялось в снижении окислительного повреждения в клетках кишечника [134].

**Глицин** является заменимой аминокислотой, участвующей в синтезе порфиринов, пуринов, креатина, желчных кислот, ингибирует ангиогенез, а также может регулировать гибель клеток и др. [135, 136]. Экспериментально подтверждено противоопухолевое действие глицина на модели индуцированного канцерогенеза печени у крыс [137]. Ингибирующий эффект глицина на рост клеток аденокарциномы молочной железы R3230 (культивируемых совместно с фибрином) авторы связывают с существенным снижением уровня белка iNOS в опухолевой ткани [138]. В другой работе ограничение в диете серина и глицина приводило к обратному эффекту — увеличению выживаемости мышей с опухолями кишечника или лимфомами [139].

Гастроэзофагеальное рефлюксное заболевание повышает риск развития аденокарциномы пищевода. Есть основания считать, что заболевание связано, в том числе, с повреждениями, вызываемыми цитотоксическими локальными концентрациями NO, образовавшегося при восстановлении НА в слюне, где накапливается до 25 % НА, поступивших с пищей и водой [140]. На модели гастродуоденального рефлюкса с сохраненной функцией желудка введение крысам связывающего НИ тиропролина (производного гетероциклической аминокислоты пролина, тиазолидин-4-карбоксильной кислоты) полностью предотвращало образование аденокарциномы пищевода, в то время как различий в возникновении плоскоклеточной карциномы пищевода в контрольной и опытной группах не было выявлено [141].

**Куркумин** — полифенол, широко используется как специя к блюдам. Обладает противовоспалительным, антиоксидантным, антиканцерогенным действием. Индуцирует детоксицирующие ферменты, в том числе глутатион-S-трансферазу. Куркумин проявил антиканцерогенную активность при опухолях толстой кишки, молочной железы, двенадцатиперстной кишки, кожи, ротовой полости и лейкозе. В основе антиканцерогенного потенциала куркумина лежит его способность подавлять пролиферацию опухолевых клеток, снижать активность транскрипционных факторов NF-κB, AP-1, экспрессию COX-2, LOX, iNOS, MMP-9, IL-1β и циклина D3, а также регулировать многочисленные факторы, вовлеченные в канцерогенез [142, 143].

### Заключение

Обобщая представленные выше данные (см. таблицу) по влиянию БАКРП на опухолевый процесс и активность iNOS, полученные на культурах опухо-

левых клеток (*in vitro*) и опухолевых моделях у животных (*in vivo*), можно заключить, что практически все тестируемые БАКРП обладают противоопухолевым потенциалом. На фоне ингибирования опухолевой прогрессии около 75 % испытанных БАКРП снижали активность iNOS или образование производных NO в опухолевой ткани; 20 % оказывали разнонаправленное действие на экспрессию/активность фермента (ресвератрол, ретинол, ГК, никотинамид) и 5 % не влияли на функцию фермента. При снижении iNOS под воздействием ЭГКГ, апигенина, N-ГФРА, омега-3-ПНЖК регистрировали одновременное снижение экспрессии NF-κB. Снижение экспрессии iNOS часто сопровождалось ингибированием VEGF (под воздействием ЭГКГ, апигенина, нобилетина, генистеина, ретиноидов), арестом различных фаз клеточного цикла (при действии ресвератрола и его аналогов, нобилетина, генистеина, ксантагумола, ИЗК). При ингибировании iNOS под воздействием апигенина, нобилетина, фенольных кислот, ИЗК, диаллилсульфида и др. регистрировали снижение активности белка, подавляющего апоптоз, — Bcl-2. Анализ показывает, что БАКРП обладают противоопухолевым потенциалом, проявляют мультитаргетный механизм действия, модулируя активность многочисленных белков и факторов, участвующих в канцерогенезе [144]. Количество вновь открываемых молекулярных мишеней, сигнальных каскадов, чувствительных к действию БАКРП, продолжает увеличиваться и помимо указанных выше включает стволовые клетки, сигнальные пути факторов роста, эпигенетические механизмы, такие как метилирование ДНК, модификация гистонов, микроРНК и др.

Полагают, что около 25 % случаев рака этиологически связаны с хроническим воспалением и инфекцией, которые могут сопровождаться активацией iNOS в клетках ткани и иммунных клетках и избытком образования АФНО [145]. Например, риск колоректального рака в 10 раз выше при воспалительных заболеваниях кишечника, таких как язвенный колит и болезнь Крона [146]. Инфицирование желудка *H. pylori* и связанное с ним воспаление могут стать причиной возникновения аденокарциномы желудка [147]. Системные воспалительные реакции характерны при прогрессии опухолей [148]. При опухолевом росте ряд диетических ингредиентов (ресвератрол, куркумин, генистеин, EGCG, нобилетин, ликопин, лупеол, ПНЖК (омега-3), содержащийся в крестоцветных сульфорафан, ИЗК и др.) может участвовать в противовоспалительных реакциях, подавляя активность провоспалительных факторов: NF-κB, COX-2, iNOS, Akt и PI3K, а также ERK [149]. Следует отметить, что механизм действия гуморальных факторов: глюкокортикоидов и TGF-β1 — известных ингибиторов iNOS, связывают также с ингибированием транскрипционного фактора NF-κB, а также STAT-1α [150, 151].

Как указывалось выше, существует много доказательств, подтверждающих промотирующую роль iNOS

Биологически активные компоненты растительных продуктов с экспериментально подтвержденными свойствами модулировать активность iNOS и ингибировать канцерогенез

Biologically active components of plant products with experimentally confirmed abilities to modulate iNOS activity and inhibit carcinogenesis

Действующее вещество Active substance	Класс соединений Substance class	Молекулярные мишени Molecular targets	Основные источники Main sources	Источник Source
Ресвератрол и его димеры, диаминометоксифлавоны, диметилированные аналоги ресвератрола (птеростильбен) Resveratrol and its dimers, diaminomethoxyflavone, dimethylated analogs of resveratrol (pterostilbene)	ПФ (фитоалексины) PPs (phytoalexins)	NF-κB↓, COX-2↓ арест цикла в фазах G1 и G2/M iNOS↑↓, eNOS↑, ингибирование пролиферации NF-κB↓, COX-2↓ G1 and G2/M checkpoint cell cycle arrest iNOS↑↓, eNOS↑, proliferation inhibition	Виноград, красное вино, голубика Grapes, red wine, blueberries	[70–73]
Эпигаллокатехин-3-галлат Epigallocatechin-3-gallate	ПФ (флаван-3-олы: катехины) PPs (flavan-3-ols: catechins)	NF-κB↓, iNOS↓, nNOS↓, VEGF↓, IGF1↓, EGFR↓, PI3K/Akt↓, Ras/Raf/MAPK↓, AP-1↓, MMP↓	Зеленый и черный чай, красное вино, красный виноград, шоколад Green and black tea, red wine, red grapes, chocolate	[75–77]
Апигенин (4',5,7-тригидроксифлавоны) Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone)	ПФ (флавоны) PPs (flavones)	NF-κB↓, Bcl-2↓, циклин D1↓, iNOS↓, Snail↓, STAT3↓, индукция апоптоза, аутофагии и др. NF-κB↓, Bcl-2↓, cyclin D1↓, iNOS↓, Snail↓, STAT3↓, apoptosis induction, autophagin and other	Сельдерей, петрушка Celery, parsley	[78, 79]
Нобилетин Nobiletin	ПФ (флавоноиды) PPs (flavonoids)	iNOS↓, ERK1/2↓, mTOR↓, арест в фазах G0/G1, Akt↓, HIF-1α↓, NF-κB↓, VEGF↓ iNOS↓, ERK1/2↓, mTOR↓, G0/G1 checkpoint arrest, Akt↓, HIF-1α↓, NF-κB↓, VEGF↓	Сок и кожура цитрусовых Citrus juice and skin	[80, 81]
Генистеин Genistein	ПФ (изофлавоны) PPs (isoflavones)	Топоизомераза II↓, MMP-9↓, iNOS↓, VEGF↓, арест в фазах G2/M Topoisomerase II↓ MMP-9↓, iNOS↓, VEGF↓, G2/M checkpoint arrest	Соя Soy	[82–84]
Галловая кислота (3,4,5-тригидроксибензойная кислота), таниновая кислота Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), tannic acid	ПФ (фенолкарбоновые кислоты) PPs (phenolic acids)	Bax↑, Bcl-2↓, Xiap↓, Akt/mTOR↓, NO-метаболиты↑↓ Ингибирование пролиферации, индукция апоптоза Bax↑, Bcl-2↓, Xiap↓, Akt/mTOR↓, NO-metabolites↑↓ Proliferation inhibition, apoptosis induction	Чай, клюква, какао-бобы, малина, клубника, сок красного винограда, красное вино, брусника, черника, щавель, ревень и др. Tea, cranberries, cacao beans, raspberries, strawberries, red grape juice, red wine, huckleberries, blackberries, sorrel, rhubarb and other	[85–87]
Ксантогумол Xanthohumol	Пренилированные флавоноиды халконового типа Prenylated flavonoids of chalcone type	Синтез ДНК↓, синтез производных NO↓, Ki-67↓, Bcl-2↓, арест в фазах G0/G1 и S, индукция апоптоза, Notch-сигнальный путь↓ DNA synthesis↓, NO derivatives synthesis↓, Ki-67↓, Bcl-2↓, G0/G1 and S checkpoint arrest, apoptosis induction, Notch-signaling pathway↓	Хмель Hops	[88, 89]
Ликопин Lycopene	Каротиноиды Carotenoids	iNOS↓, COX-2↓, MMP↓, MAPK↓, Ki-67↓, EMT-маркеры↓, FAK↓ и др. iNOS↓, COX-2↓, MMP↓, MAPK↓, Ki-67↓, EMT markers↓, FAK↓ and other	Фрукты, овощи красного и оранжевого цвета и продукты их переработки, грейпфрут розовый, папайя Fruit, red and orange vegetables and their processing products, pink grapefruit, papaya	[90, 91]

Продолжение таблицы

Continuation of table

Действующее вещество Active substance	Класс соединений Substance class	Молекулярные мишени Molecular targets	Основные источники Main sources	Источник Source
Лулеол Lupeol	Пентациклические тритерпены Pentacyclic triterpenes	iNOS↓, ODC↓, COX-2↓, PI3K↓, pAkt↓, p-ERK↓, p-EGFR↓, MMP-9↓, пролиферация↓, индукция апоптоза и др. iNOS↓, ODC↓, COX-2↓, PI3K↓, pAkt↓, p-ERK↓, p-EGFR↓, MMP-9↓, proliferation↓, apoptosis induction and other	Олива, манго, инжир, зеленый перец, клубника, виноград Olive, mango, figs, green pepper, strawberries, grapes	[92–94]
Индол-3-карбинол Indole-3-carbinol	Индолы Indoles	NF-κB↓, Bcl-2↓, p-каспаза-9↓, pAkt↓, MMP-9↓, AhR↑, E-кадгерин↑, арест фазы G1, пролиферация↓, индукция апоптоза и др. NF-κB↓, Bcl-2↓, p-caspase-9↓, pAkt↓, MMP-9↓, AhR↑, E-cadherin↑, G1 checkpoint arrest, proliferation↓, apoptosis induction and other	Овощи семейства крестоцветных (белокочанная, брюссельская, цветная капуста, кольраби, брокколи), редис, репа, брюква Cruciferae vegetables (white cabbage, brussels sprouts, cauliflower, kohlrabi, broccoli), radish, turnip, rutabaga	[95–97]
Ретинол, трансретиновые кислоты, N-(4-гидроксифенил) ретинамид Retinol, transretinoic acids, N-(4-hydroxyphenyl) retinamide	Ретиноиды Retinoids	iNOS↑↓, eNOS↑, c-мус↓, циклин D1↓, Vegf-A↓, MMP-9↓, NOS mPHK↓, индукция апоптоза iNOS↑↓, eNOS↑, c-myc↓, cyclin D1↓, Vegf-A↓, MMP-9↓, NOS mRNA↓, apoptosis induction	Печень говяжья, печень трески, сливочное масло, яйца Beef liver, cod liver, butter, eggs	[98–101]
Докозагексаеновая кислота, эйкозапентаеновая кислота Docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid	Полиненасыщенные жирные кислоты класса омега-3 Omega-3 polyunsaturated fatty acids	iNOS↓, COX-2↓, NF-κB↓, p21↑, p27↑, β-катенин↓ iNOS↓, COX-2↓, NF-κB↓, p21↑, p27↑, β-catenin↓	Жиры рыб: сельдь, лосось, скумбрия, сардины, печень трески и др. Fish oil: herring, salmon, mackerel, cod liver and other	[102, 103, 105, 106]
Токоферолы (α, γ) Tocopherols (α, γ)	Витамины Vitamins	iNOS↓, NADPH↓, белки HSP↓, HO-1↓, индукция апоптоза, ингибирование клеточного цикла iNOS↓, NADPH↓, HSP proteins↓, HO-1↓, apoptosis induction, cell cycle inhibition	Растительные масла (больше в нерафинированных), рыбий жир, зародыши пшеницы, ржаные и пшеничные отруби, орехи, семена, шпинат и др. Plant oils (more in unrefined), fish oil, wheat germs, wheat bran, rye bran, nuts, seeds, spinach and other	[109–111]
Аскорбиновая кислота (витамин С) Ascorbic acid (vitamin C)	Витамины Vitamins	iNOS↓, eNOS↑, ROS↓, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа↓, N-нитрозосоединения↓ iNOS↓, eNOS↑, ROS↓, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase↓, N-nitroso compounds↓	Шиповник, черная смородина, облепиха, сладкий перец, киви, цитрусовые, укроп, петрушка, рябина, другие овощи и фрукты Briar, black currant, sawlow thorn, sweet pepper, kiwi, citrus, dill, parsley, mountain ash, other fruits and vegetables	[109, 112, 114, 117, 118, 127]
Пиридоксин (витамин B <sub>6</sub> ) Pyridoxin (vitamin B <sub>6</sub> )	Витамины Vitamins	iNOS↓, c-мус↓, c-fos↓, пролиферация↓, ангиогенез↓ iNOS↓, c-myc↓, c-fos↓, proliferation↓, angiogenesis↓	Красное мясо, птица, субпродукты, рыба, крупы (гречневая, овсяная, пшеничная, ячменная, кукурузная), бобовые, орехи, дрожжи сухие пивные, хлеб из муки грубого помола Red meat, bird meat, subproducts, fish, grains (buckwheat, oats, wheat, barley, corn), beans, nuts, dry brewers yeast, bread made of coarse flour	[128, 129]

Окончание таблицы

End of table

Действующее вещество Active substance	Класс соединений Substance class	Молекулярные мишени Molecular targets	Основные источники Main sources	Источник Source
Никотинамид Nicotinamide	Витамины Vitamins	TNF↓, IL-6↓, PGE <sub>2</sub> ↓, ROS↓, NO↓↑, eNOS↑, N-нитрозосоединения↓ TNF↓, IL-6↓, PGE <sub>2</sub> ↓, ROS↓, NO↓↑, eNOS↑, N-nitroso compounds↓	Тощее мясо, птица, печень, рыба, молоко, бобовые, яйца, хлеб и крупы Lean meat, bird meat, liver, fish, milk, beans, eggs, bread and grains	[130, 131]
Диаллилдисульфид, аллилцистеин, S-метилцистеин, N-ацетилцистеин Diallyl disulfide, allyl cysteine, S-methylcysteine, N-acetylcysteine	Серосодержащие вещества Sulfur-containing compounds	IGF1 мРНК↓, iNOS мРНК↓, E-кадгерин↑, Bcl-2↓, пролиферация↓, апоптоз↑ IGF1 mRNA↓, iNOS mRNA↓, E-cadherin↑, Bcl-2↓, proliferation↓, apoptosis↑	Лук репчатый, чеснок, брюква, хрен, горчица, горох, бобы Onions, garlic, rutabaga, horse radish, mustard, peas, beans	[132–134]
Глицин Glycine	Аминокислоты Amino acids	iNOS↓, ангиогенез↓ iNOS↓, angiogenesis↓	Пищевые белки, эндогенный синтез Food proteins, endogenous synthesis	[135–138]
Тиопролин (тиазолидин-4-карбоксильная кислота) Thioprolin (thiazolidine-4-carboxylic acid)	Производное аминокислоты пролина Derivative of amino acid proline	Нитриты↓ Nitrites↓		[141]
Куркумин Curcumin	ПФ PPs	NF-κB↓, AP-1↓, COX-2↓, LOX↓, iNOS↓, MMP-9↓, IL-1β↓, циклин D3↓, пролиферация↓ NF-κB↓, AP-1↓, COX-2↓, LOX↓, iNOS↓, MMP-9↓, IL-1β↓, cyclin D3↓, proliferation↓	Корень куркумы (семейство имбирных) Curcuma root (ginger family)	[142, 143]

**Примечание.** iNOS – индуцибельная NO-синтаза (NOS); ПФ – полифенолы; NF-κB – ядерный фактор κB; COX-2 – циклооксигеназа-2; eNOS – эндотелиальная NOS; nNOS – нейрональная NOS; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; PI3K (фосфоинозитид-3-киназа), Akt (протеинкиназа B), PI3K/Akt – сигнальный путь; Ras – онкоген, Raf – протеинкиназа, MAPK – митогенактивируемая протеинкиназа, Ras/Raf/MAPK – сигнальный путь, регулирует рост, деление, дифференцировку клеток; AP-1 – фактор транскрипции; MMP – матриксные металлопротеиназы; Bcl-2 – регулятор апоптоза; циклин D1 – протоонкоген, регулятор клеточного цикла; Snail – транскрипционный фактор; STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции; ERK 1/2 – внеклеточные сигнальрегулируемые киназы; mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих, протеинкиназа; HIF-1α – фактор, индуцируемый гипоксией 1α; Bax – проапоптотический белок; Xiap – связанный с X-хромосомой белок, ингибитор апоптоза; Ki-67 – маркер пролиферации; Notch-сигнальный путь – регулирует пролиферацию, апоптоз, дифференцировку клеток; EMT – эпителиально-мезенхимальный переход; FAK – киназа фокальных контактов; ODC – орнитиндекарбоксилаза; AhR – арил-гидрокарбонный рецептор; c-тус – онкоген; Vegf-A – фактор роста эндотелия сосудов A; мРНК – матричная РНК; p21 – белок, ингибитор циклинзависимой киназы 1A; p27 – белок, ингибитор циклинзависимой киназы 1B; HSP – белки теплового шока; HO-1 – индуцибельная форма гемогсигеназы; ROS – активные формы кислорода; c-fos – протоонкоген; TNF – фактор некроза опухоли; IL-6 – интерлейкин 6; PGE<sub>2</sub> – простагландин E2; LOX – липоксигеназа; циклин D3 – регулятор клеточного цикла; ↓ обозначает пониженную активность (или экспрессию) белков и факторов. ↑ – повышенную активность (или экспрессию) белков и факторов.

**Note.** iNOS – inducible NO-synthase (NOS); PPs – polyphenols; NF-κB – nuclear factor κB; COX-2 – cyclooxygenase-2; eNOS – endothelial NOS; nNOS – neuronal NOS; VEGF – vascular endothelial growth factor; IGF-1 – insulin like growth factor 1; EGFR – epidermal growth factor receptor; PI3K (phosphoinositide 3 kinases), Akt (protein kinase B), PI3K/Akt – signaling pathway; Ras – oncogene, Raf – protein kinase, MAPK – mitogen-activated protein kinase, Ras/Raf/MAPK is a signaling pathway that regulates growth, division, differentiation of cells; AP-1 – transcription factor; MMP – matrix metalloproteinases; Bcl-2 – apoptosis regulator; cyclin D1 – proto-oncogene, regulator cell cycle; Snail – transcription factor; STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3; ERK 1/2 – extracellular signal regulated kinases; mTOR – the mammalian target of rapamycin, protein kinase; HIF-1α – hypoxia-inducible factor 1α; Bax – the proapoptotic protein; Xiap – X-linked inhibitor of apoptosis protein; Ki-67 – proliferation marker; Notch-signaling pathway – regulates cell proliferation, apoptosis, cell differentiation; EMT – epithelial-mesenchymal transition; FAK – focal adhesion kinase; ODC – ornithine decarboxylase; AhR – aryl hydrocarbon receptor; c-myc – oncogene; Vegf-A – vascular endothelial growth factor A; mRNA – matrix RNA; p21 – protein, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; p27 – protein, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; HSP – heat shock proteins; HO-1 – inducible form of the heme oxygenase; ROS – reactive oxygen species; c-fos – proto-oncogen; TNF – tumor necrosis factor; IL-6 – interleukin 6; PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E2; LOX – lipoxygenase; cyclin D3 – cell cycle regulator; ↓ denotes decreased activity (or expression) of proteins and factors; ↑ – increased activity (or expression) of proteins and factors.



в развитии опухолей как у человека, так и у животных, но также имеется и достаточное количество исследований, показывающих, что NO может ингибировать неоплазию и метастазирование *in vivo*. Ингибирующий эффект NO связывают с цитотоксичностью NO к опухолевым клеткам, с антиоксидантными свойствами молекулы, способностью инициировать апоптоз, ингибировать агрегацию тромбоцитов и др. Наличие парадокса объясняют рядом факторов, включая уровень локальной концентрации NO, типом клеток и их генетическими особенностями, а также окислительно-восстановительным статусом клеток. Необходимо заметить, что большинство исследований, которые демонстрируют ингибирование роста опухоли NO, использует биологические системы с высокой экспрессией iNOS или высокие концентрации доноров NO. Большинство же имеющихся данных показывает, что регистрируемые в опухолях уровни экспрессии iNOS стимулируют развитие опухолей.

Следует отметить еще одну особенность. В рассмотренных нами экспериментальных работах изучали действие достаточно высоких концентраций отдельных БАКРП, превышающих их уровни в стандартных рационах животных. Повседневный рацион человека содержит БАКРП в низких концентрациях и, что существенно, они поступают в составе многокомпонентных смесей. Опыт показывает, что БАКРП демонстрируют биологический ответ при более низких концентрациях в сыворотке крови, такие концентрации в системе *in vitro* не эффективны. По-видимому, при оценке биоактивности БАКРП в тестовых системах *in vitro* необходимо стремиться к воспроизведению условий, близких к физиологическим. Многие полагают, что текущего потребления БАКРП в рационе недостаточно, чтобы защитить организм от неблагоприятного воздействия канцерогенов или оказать ингибирующее влияние на опухолевый процесс, и в качестве альтернативного подхода рассматривают дополнительный прием биологически активных добавок. Однако в некоторых случаях на примере диетических флавоноидов, которые имеют низкую биодоступность, для проявления противоопухолевого эффекта *in vivo* требуются высокие дозы, которые могут оказывать повреждающее действие на ДНК. Способность некоторых флавоноидов модулировать сигнальные пути (NF-κB, AP-1, MAPK и др.) может вести к усилению пролиферации и выживаемости клеток, инициировать воспалительный ответ и вызывать побочные эффекты: печеночную недостаточность, дерматиты, анемию и др. [152]. Побочные эффекты флавоноидов связывают также с неустойчивым равновесием между их антиоксидантными и прооксидантными свойствами, которые зависят от многочисленных факторов, определяющих метаболический статус организма. Примером могут служить результаты, полученные нами с использованием препарата из виноградных косточек, стандартизованного по содержанию олигомерных проантоцианидинов, проявившего

*in vitro* высокую антиоксидантную активность. В опыте на мышах регулярное введение препарата в высокой дозе (300 мг/кг массы тела животного) достоверно стимулировало на 45 % рост карциномы Эрлиха на фоне повышенной продукции АФНО [97].

Противоопухолевый эффект, а также биодоступность активного компонента могут изменяться, если он поступает в комбинации с другими веществами. Например, пиперин (алкалоид, содержится в черном и длинном перце), действующий совместно с куркумином, повышал уровень фенольной субстанции в плазме крови крыс [153]. Пероральное введение мышам ГК, или ИЗК, или микроводоросли спирулины, обогащенной Se, вызывало задержку формирования опухолевых узлов и торможение роста опухолей. В то же время на фоне введения комбинации спирулины с ГК или ИЗК регистрировали достоверное ускорение роста перевиваемых опухолей [154].

Подтвержденная экспериментально цитотоксическая и антипролиферативная активность флавоноидов по отношению к опухолевым клеткам с минимальной токсичностью к здоровым клеткам заслуживает самого пристального внимания при рассмотрении этих соединений в качестве профилактических, а также противоопухолевых соединений. Однако данные многочисленных клинических исследований показывают, что терапевтическая эффективность флавоноидов при опухолях весьма незначительна [155]. Для повышения биодоступности и противоопухолевой эффективности наиболее перспективных БАКРП (стильбенов, флавоноидов и танинов) модифицируют их структуру, а также разрабатывают новые способы доставки веществ к опухолям с помощью нанотехнологий, и в этом направлении сделаны первые шаги [156, 157]. Можно ожидать, что на основании научных достижений в области генетики, химии и молекулярной биологии будут предприняты усилия по разработке функциональных продуктов с заданными характеристиками, повышающими их биологическую ценность, что, возможно, позволит их использовать в онкопрофилактике [158]. Несмотря на то что в экспериментальных работах многие биоактивные компоненты демонстрируют противоопухолевые эффекты, этого недостаточно, чтобы рекомендовать их регулярное потребление в виде биологически активных добавок в целях профилактики онкологических заболеваний. Необходимы подтвержденные в клинических исследованиях убедительные научные обоснования их противоопухолевой эффективности и безопасности.

Таким образом, суммируя данные литературы и собственные результаты, можно заключить, что многие БАКРП снижают активность iNOS, ответственной за образование АФНО, тем самым уменьшая их проопухолевые эффекты. Можно считать оправданной стратегию, скорее направленную на снижение активности iNOS, в том числе с помощью диеты с высоким содержанием фруктов и овощей, богатых БАКРП.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420(6917): 860–7. DOI: 10.1038/nature01322. PMID: 12490959.
- Vannini F., Kashfi Kh., Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol* 2015;6:334–43. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.009. PMID: 26335399.
- Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S. et al. The Chemical biology of nitric oxide. Implication in Cellular Signaling. *Free Radic Biol Med* 2008;45(1):18–316. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020. PMID: 18439435.
- Benetou V., Orfanos P., Lagiou P. et al. Vegetables and fruits in relation to cancer risk: evidence from the Greek EPIC cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(2):387–92. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2665. PMID: 18268122.
- Kaur V., Kumar M., Kumar A. et al. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: implications in cancer chemoprevention and future perspectives. *Biomed Pharmacother* 2018;97:564–86. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.124. PMID: 29101800.
- Weng Ch.J., Yen G.Ch. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev* 2012;38(1):76–87. DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.03.001. PMID: 21481535.
- Steward W.P., Brown K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *British J Cancer* 2013;109(1):1–7. DOI: 10.1038/bjc.2013.280. PMID: 23736035.
- IARC monographs. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. Vol. 94. Lyon, 2010. Pp. 45–325.
- Дерягина В.П., Машковцев Ю.В., Ильницкий А.П. Экспериментальное изучение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов в условиях воздействия нитрита натрия. *Биомедицинская химия* 2003;49(1):19–26. [Deryagina V.P., Mashkovtsev Yu.V., Ilnitsky A.P. Experimental study of the functional activity of neutrophils and macrophages under conditions of exposure to sodium nitrite. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2003;49(1):19–26. (In Russ.)].
- Вредные вещества в промышленности. Том 3. Ленинград: Химия, 1977. 607 с. [Harmful substances in industry. Vol. 3. Leningrad: Khimiya, 1977. 607 p. (In Russ.)].
- Жукова Г.Ф., Архипов Г.Н., Ивашкина А.С., Пименова В.В. Канцерогенное действие предшественников при введении внутрь мышам совместно с ингибиторами. В кн.: Биологический эффект канцерогенных нитрозосоединений. Псков. Л.: б. и., 1980. С. 55–57. [Zhukova G.F., Arkhipov G.N., Ivashkina A.S., Pimenova V.V. The carcinogenic effect of precursors when administered to mice in conjunction with inhibitors. In: *The biological effect of carcinogenic nitroso compounds*. Pskov. L.: б. и., 1980. Pp. 55–57. (In Russ.)].
- Юрченко В.А., Ильницкий А.П., Ермилов И.Б. и др. Образование канцерогенных нитрозаминов из малого количества предшественников в желудочном соке человека. *Экспериментальная онкология* 1990;12(2):24–6. [Yurchenko V.A., Ilnitsky A.P., Ermilov I.B. et al. Formation of carcinogenic nitrosamines from a small amount of precursors in human gastric juice. *Ekspierimental'naya onkologiya = Experimental Oncology* 1990;12(2):24–6. (In Russ.)].
- Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. 156 с. [Reutov V.P., Sorokina E.G., Okhotin V.E., Kositsyn N.S. Cyclic transformations of nitric oxide in mammals. Moscow: Nauka, 1997. 156 p. (In Russ.)].
- Zhang X., Lin Y., Gillies R.J. Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med* 2010;51(8):1167–70. DOI: 10.2967/jnumed.109.068981. PMID: 20660380.
- Ilnitsky A.P., Reutov V.P., Ryzhova N.I. et al. Urethane-induced pulmonary adenoma and Rausher's leukemia modified by sodium nitrite in mice: a possible role for nitric oxide and nitric dioxide. *Exp Oncol* 1997;19:101–9.
- Ильницкий А.П., Рыжова Н.И., Чудина А.П. и др. Потенцирующее действие нитрита натрия на развитие спонтанных и индуцированных 1,2-диметилгидразином опухолей у мышесамцов F1 (C57BlxСВА). *Вопросы онкологии* 2004;50(6):683–8. [Ilnitsky A.P., Ryzhova N.I., Chudina A.P. et al. The potentiating effect of sodium nitrite on the development of spontaneous and 1,2-dimethylhydrazine-induced tumors in F1 male mice (C57BlxСВА). *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2004;50(6):683–8 (In Russ.)].
- Ильницкий А.П., Юрченко В.А., Жукова Г.Ф., Ермилов В.Б. Оценка степени канцерогенной опасности малых доз нитритов. *Вопросы питания* 1989;35(7):843–8. [Ilnitsky A.P., Yurchenko V.A., Zhukova G.F., Ermilov V.B. Assessment of the carcinogenic risk of low doses of nitrite. *Voprosy pitaniya = Nutrition Issues* 1989;35(7):843–8. (In Russ.)].
- Реутов В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности. *Биохимия* 2002;67(3):353–76. [Reutov V.P. The cycle of nitric oxide in mammals and the principle of cyclicity. *Biokhimiya = Biochemistry* 2002;67(3):353–76. (In Russ.)].
- Реутов В.П., Ажипа Я.И., Каюшин Л.П. Изучение методом электронного парамагнитного резонанса продуктов взаимодействия оксидов азота с некоторыми органическими соединениями. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1978;9:299–301. [Reutov V.P., Azhipa Ya.I., Kayushin L.P. The study by the method of electron paramagnetic resonance products of the interaction of nitrogen oxides with some organic compounds. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1978;9:299–301. (In Russ.)].
- Реутов В.П., Ажипа Я.И., Каюшин Л.П. Исследование парамагнитных центров, возникающих при взаимодействии двуокиси азота с олеиновой кислотой и тирозином. *Доклады Академии наук СССР* 1978;241(6):1375–7. [Reutov V.P., Azhipa Ya.I., Kayushin L.P. The study of paramagnetic centers arising from the interaction of nitrogen dioxide with oleic acid and tyrosine. *Doklady Akademii nauk SSSR = Report Academy of Sciences of the USSR* 1978;241(6):1375–7. (In Russ.)].
- Реутов В.П., Орлов С.Н. Физиологическое значение гуанилатциклазы и роль окиси азота и нитросоединений в регуляции активности этого фермента. *Физиология человека* 1993;19(1):124–37. [Reutov V.P., Orlov S.N. The physiological significance of guanylate cyclase and the role of nitric oxide and nitro compounds in the regulation of the activity of this enzyme. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology* 1993;19(1):124–37. (In Russ.)].
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265–9. PMID: 2827174.
- Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33(7):829–37. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304. PMID: 21890489.
- Tendler D.S., Bao C., Wang T. et al. Intersection of interferon and hypoxia signal transduction pathways in nitric oxide-induced tumor apoptosis. *Cancer Res* 2001;61(9):3682–8. PMID: 11325839.



25. Nathan C.F., Hibbs J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991;3(1):65–70. PMID: 1711326.
26. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357: 593–615. PMID: 11463332.
27. Запорожан В.Н., Гоженко А.И., Корнеенко Т.В., Дубинина В.Г. Биологическая активность оксида азота в механизмах опухолевого роста. *Успехи физиологических наук* 2004;35(1): 66–82. [Zapozozhan V.N., Gozhenko A.I., Korneenko T.V., Dubinina V.G. Biological activity of nitric oxide in the mechanisms of tumor growth. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Advances in Physiological Sciences* 2004;35(1):66–82. (In Russ.)].
28. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Реутов В.П. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза. *Вестник РАМН* 2000;4:30–4. [Zenkov N.K., Men'shchikova E.B., Reutov V.P. NO synthase is normal and in the pathology of various genesis. *Vestnik RAMN = Bulletin of RAMS* 2000;4:30–4. (In Russ.)].
29. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V., Golubeva I.S. Formation of nitric oxide metabolites during growth of transplanted tumors with different metastatic potential. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Series B: Biomed Chemistry* 2015;9(2):130–6. DOI: 10.1134/S1990750815020055.
30. Кондакова И.В., Загребельная Г.В., Реутов В.П. Влияние пероксидных радикалов и оксида азота на пролиферирующую активность опухолевых клеток. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медико-биологических наук* 2003;1:78–82. [Kondakova I.V., Zagrebelaya G.V., Reutov V.P. Effect of peroxide radicals and nitric oxide on the proliferating activity of tumor cells. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya medico-biologicheskikh nauk = News of the National Academy of Sciences of Belarus. Biomedical Science Series* 2003;1:78–82. (In Russ.)].
31. Reutov V.P. Nitric oxide cycle in mammals and the cyclicity principle. *Biochemistry (Moscow)* 2002;67(3):293–311. PMID: 11970729.
32. Bonavida B., Khineche S., Huerta-Yepez S., Garban H. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. *Drug Resist Updates* 2006;9(3):157–73. DOI: 10.1016/j.drug.2006.05.003. PMID: 16822706.
33. Pautz A., Art J., Hahn S. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 2010;23:75–93. DOI: 10.1016/j.niox.2010.04.007. PMID: 20438856.
34. Дерягина В.П. Образование свободно-радикальных соединений при действии нитрита натрия на организм животных и в условиях *in vitro*. *Токсикологический вестник* 2003;6:20–5. [Deryagina V.P. The formation of free radical compounds under the action of sodium nitrite on the organism of animals and *in vitro*. *Toksikologicheskii vestnik = Toxicological messenger* 2003;6:20–5. (In Russ.)].
35. Menshikova E.B., Zenkov N.K., Reutov V.P. Nitric oxide and NO-synthase in mammals in different functional states. *Biochemistry (Moscow)* 2000;65(4): 409–26.
36. Reutov V.P., Kayushin L.P., Sorokina E.G. Physiological role of nitric oxide cycle in human and animal organism. *Hum Physiol* 1994;20:219–29.
37. Friebe A., Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 2003;93:96–105. DOI: 10.1161/01.RES.0000082524.34487.31. PMID: 12881475.
38. Dangel O., Mergia E., Karlisch K. et al. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost* JTH 2010;8:1343–52. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03806.x. PMID: 20149081.
39. Heinrich T.A., da Silva R.S., Miranda K.M. et al. Biological nitric oxide signaling: chemistry and terminology. *Brit J Pharmac* 2013;169(7):1417–29. DOI: 10.1111/bph.122. PMID: 23617570.
40. Wink D.A., Kaspizak K.S., Maragos C.M. et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991;254(5034): 1001–3. PMID: 1948068.
41. Azad N., Vallyathan V., Wang L. et al. S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppressed apoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:34124–34. DOI: 10.1074/jbc.M602551200. PMID: 16980304.
42. Wright C., Iyer A.K., Kulkarni Y., Azad N. S-Nitrosylation of Bcl-2 negatively affects autophagy in lung epithelial cells. *J Cell Biochem* 2016;117(2):521–32. DOI: 10.1002/jcb.25303. PMID: 26241894.
43. Raines K.W., Bonini M.G., Campbell S.L. Nitric Oxide cell signaling: S-nitrosation of Ras superfamily GTPases. *Cardiovasc Res* 2007;75(2):229–39. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.04.013. PMID: 17559822.
44. Lee S.Y., Rim Y., McPherson D.D. et al. A novel liposomal nanomedicine for nitric oxide delivery and breast cancer treatment. *Biomed Mater Eng* 2014;24(1):61–7. DOI: 10.3233/BME-130784. PMID: 24211883.
45. Ambs S., Merriam W.G., Bennett W.P. et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res* 1998;58(2):334–41. PMID: 9443414.
46. Gallo O., Masini E., Morbidelli L. et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(8):587–96. PMID: 9554441.
47. Thomas D.D., Espey M.G., Ridnour L.A. et al. Hypoxic inducible factor 1 alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(24):8894–9. DOI: 10.1073/pnas.0400453101. PMID: 15178764.
48. Espey M.G., Miranda K.M., Pluta R.M., Wink D.A. Nitrosative capacity of macrophages is dependent on nitric-oxide synthase induction signals. *J Biol Chem* 2000;275(15):11341–7. DOI: 10.1074/jbc.275.15.11341. PMID: 10753947.
49. Ambs S., Hussain S.P., Harris C.C. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J* 1997;11(6):443–8. PMID: 9194524.
50. Kim Y.M., Talanian R.V., Billiar T.R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1997;272(49):31138–48. PMID: 9388267.
51. Kotamraju S., Tampo Y., Keszler A. et al. Nitric oxide inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced transferrin receptor-dependent apoptosis in endothelial cells: role ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(19):10653–8. DOI: 10.1073/pnas.1933581100. PMID: 12958216.
52. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). М.: Вузovская книга, 2004. 360 с. [Granik V.G., Grigoriev N.B. Nitric oxide (NO). Moscow: Vuzovskaya kniga, 2004. 360 p. (In Russ.)].
53. Crowell J.A., Steele V.E., Sigman C.C., Fay J.R. Is inducible nitric oxide synthase a target for chemoprevention? *Mol Cancer Ther* 2003;2(8):815–23. PMID: 12939472.
54. Janakiram N.B., Rao Ch.V. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Med Chem* 2012;4(17):2193–204. DOI: 10.4155/fmc.12.168. PMID: 23190107.
55. Rigas B. Novel agents for cancer prevention based on nitric oxide. *Bioch Soc Trans* 2007;35(Pt5):1364–8. DOI: 10.1042/BST0351364. PMID: 17956352.
56. Rao C.V., Reddy B.S., Steele V.E. et al. Nitric oxide-releasing aspirin and indomethacin are potent inhibitors against colon cancer in azoxymethane-treated

- rats: effects on molecular targets. *Mol Cancer Ther* 2006;5(6):1530–8. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0061. PMID: 16818512.
57. Дерягина В.П., Любчанская В.М., Рыжова Н.И. и др. Динамика роста карциномы Эрлиха у мышей F1 под воздействием доноров NO – производных 3-нитробензофурана и 3-нитроиндола. *Российский биотерапевтический журнал* 2009;(1):60–3. [Deryagina V.P., Lyubchanskaya V.M., Ryzhova N.I. et al. The growth dynamics of Ehrlich carcinoma in F1 mice under the influence of NO donors – derivatives of 3-nitrobenzofuran and 3-nitroindole. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2009;(1):60–3. (In Russ.)].
  58. Дерягина В.П., Рыжова Н.И. Действие модуляторов NO-синтаз на рост перививной аденокарциномы Эрлиха. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2007;18(2):32–8. [Deryagina V.P., Ryzhova N.I. The effect of NO synthase modulators on the growth of Ehrlich transplantable adenocarcinoma. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina = Bulletin of the Russian Cancer Research Center. N.N. Blokhin RAMS* 2007;18(2):32–8. (In Russ.)].
  59. Kashfi K., Rigas B. Molecular targets of nitric-oxide-donating aspirin in cancer. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt):701–4. DOI: 10.1042/BST0330701. PMID: 16042578.
  60. Thomsen L.L., Scott J.M.J., Topley P. et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth *in vivo*: studies with 1400 W, a novel inhibitor. *Cancer Res* 1997;57:3300–4. PMID: 9242464.
  61. Tang W., Li H., Poulos T.L., Silverman R.B. Mechanistic studies of inactivation of inducible nitric oxide synthase by amidines. *Biochemistry* 2015;54(15):2530–8. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00135. PMID: 25811913.
  62. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Golubkina N.A. Production of nitrogen oxide derivatives under the influence of NO-synthase inhibitors and natural compounds in mice with transplanted tumors. *Exp Oncol* 2012;34(1):1–5. PMID: 22453145.
  63. Дейчман Г.И. Роль естественной резистентности в реакции организма на возникновение, рост и метастазирование опухолей. *Итоги науки и техники* 1984;13:46–97. [Deychman G.I. The role of natural resistance in the body's response to the occurrence, growth and metastasis of tumors. *Itigi nauki i tekhniki = Results of science and technology* 1984;13:46–97. (In Russ.)].
  64. Perrotta C., Cervia D., Di Renzo I. et al. Nitric oxide generated by tumor-associated macrophages is responsible for cancer resistance to cisplatin and correlated with syntaxin 4 and acid sphingomyelinase inhibition. *Front Immunol* 2018;9:1186. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01186. PMID: 29896202.
  65. Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M.P. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev* 2006;26(6):7–66. DOI:10.1002/med.20060. PMID:16710860.
  66. Maldonado-Rojas W., Olivero-Verbel J. Food-related compounds that modulate expression of inducible nitric oxide synthase may act as its inhibitors. *Molecules* 2012;17(7):8118–35. DOI: 10.390/molecules.17078118. PMID: 22766803.
  67. Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouysegou L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed* 2011;50:586–621. DOI:10.1002/anie.201000044. PMID: 21226137.
  68. Azqueta A., Collins A. Polyphenols and DNA damage: a mixed blessing. *Nutrients* 2016;8(12):785. DOI: 10.3390/nu8120785. PMID: 27918471.
  69. Hara A., Okayasu I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathol* 2004;108(1):43–8. DOI: 10.1007/s00401-004-0860-0. PMID: 15088099.
  70. Kim Y.A., Lim S.Y., Rhee S.H. et al. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells. *Int J Mol Med* 2006;17(6):1069–75. PMID:16685418.
  71. Holian O., Wahid S., Atten M.J., Attar B.M. Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282(5):G809–16. DOI: 10.1152/ajpgi.00193.2001. PMID: 11960777.
  72. Notas G., Nifli A.P., Kampa M. et al. Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation. *Biochem Biophys Acta* 2006;1760:1657–66. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.09.010. PMID: 17052855.
  73. Billard C., Izard J.C., Roman V. et al. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 2002;43(10):1991–2002. DOI: 10.1080/1042819021000015952. PMID: 12481898.
  74. Nanjoo S., Shiby P., Xingpei H. et al. Pterostilbene, an active constituent of blueberries, suppresses aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced colon carcinogenesis model in rats. *Clin Cancer Research* 2007;13(1):350–5. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1528. PMID: 17200374.
  75. Nechuta S., Shu X.O., Li H.L. et al. Prospective cohort study of tea consumption and risk of digestive system cancers: results from the Shanghai women's health study. *J Clin Nutr* 2012;96(5):1056–63. DOI: 10.3945/ajcn.111.031419. PMID: 23053557.
  76. Chan M.M., Fong D., Ho C.T., Huang H.I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol* 1997;54(12):1281–6. PMID: 9393670.
  77. Singh R., Ahmed S., Islam N. et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappaB activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappaB. *Arthritis Rheum* 2002;46(8):2079–86. DOI: 10.1002/art.10443. PMID: 12209512.
  78. Salmani J.M.M., Zhang X.P., Jacob J.A., Chen B.A. Apigenin's anticancer properties and molecular mechanisms of action: recent advances and future perspectives. *Chin J Natur Med* 2017;15(5):321–9. DOI: 10.1016/S1875-5364(17)30052-3. PMID: 28558867.
  79. Shankar E., Goel A., Gupta K., Gupta S. Plant flavone apigenin: an emerging anticancer agent. *Curr Pharmacol Rep* 2017;3(6):423–46. DOI: 10.1007/s40495-017-0113-2. PMID: 29399439.
  80. Chen J., Chen A.Y., Huang H. et al. The flavonoid nobiletin inhibits tumor growth and angiogenesis of ovarian cancer via the Akt pathway. *Int J Oncol* 2015;46(6):2629–38. DOI: 10.3892/ijo.2015.2946. PMID: 25845666.
  81. Nishino H., Tokuda H., Satomi Y. et al. Cancer prevention by antioxidants. *Biofactors* 2004;22(1–4):57–61. PMID: 15630252.
  82. Applegate C.C., Rowles J.L., Ranard K.M. et al. Soy consumption and risk of prostate cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 2018;10(1). DOI: 10.3390/nu10010040. PMID: 29300347.
  83. Ravindranath M.H., Muthugounder S., Presser N., Viswanathan S. Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genestein. *Adv Exp Med Biol* 2004;546(1):121–65. PMID: 15584372.
  84. Feinstein D.L., Galea E., Cermak J. et al. Nitric oxide synthase expression in glial cells: suppression by tyrosine kinase inhibitors. *J Neurochem* 1994;62(2):811–4. PMID: 7507517.
  85. Faried A., Kurnia D., Faried L.S. et al. Anticancer effects of gallic acid isolated

- from Indonesian herbal medicine, *Phaleria maccarcarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int J Oncol* 2007;30(3):605–13. PMID: 17273761.
86. Sourani Z., Pourghesary B., Beshkar P. et al. Gallic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in lymphoblastic leukemia cell line (C121). *Iran J Med Sci* 2016;41(6):525–30. PMID: 27853333.
87. Антошина Е.Е., Горькова Т.Г., Дерягина В.П., Рыжова Н.И. Ингибирующее действие фенольных кислот и разных форм микроводоросли спирулины на рост карциномы Эрлиха у мышей. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2009;20(4):26–31. [Antoshina E.E., Gorkova T.G., Deryagina V.P., Ryzhova N.I. The inhibitory effect of phenolic acids and various forms of microalgae spirulina on the growth of Ehrlich carcinoma in mice. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina* = *Bulletin RCRC them. N.N. Blokhin RAMS* 2009;20(4):26–31. (In Russ.)].
88. Sun Z., Zhou C., Liu F. et al. Inhibition of breast cancer cell survival by xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. *Oncol Lett* 2018;15(1):908–16. DOI: 10.3892/ol.2017.7434. PMID: 29422966.
89. Gerhauser C., Alt A., Heiss E. et al. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther* 2002;1(11):959–69. PMID: 12481418.
90. Кравченко Л.В., Морозов С.В., Дерягина В.П. и др. Антиоксидантный статус крыс, получавших разное количество ликопина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2003;135(4):414–8. [Kravchenko L.V., Morozov S.V., Deryagina V.P. et al. Antioxidant status of rats treated with different amounts of lycopene. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2003;135(4):414–8. (In Russ.)].
91. Holzapfel N.P., Shokohmand A., Wagner F. et al. Lycopene reduced ovarian tumor growth and intraperitoneal metastatic load. *Am J Cancer Res* 2017;7(6):1322–36. PMID: 28670494.
92. Liu Y., Bi T., Shen G. et al. Lupeol induces apoptosis and inhibits invasion in gallbladder carcinoma GBC-SD cells by suppression of EGFR/MMP9 signaling pathway. *Cytotechnology* 2016;68(1):123–33. DOI: 10.1007/s10616-014-9763-7. PMID: 25037728.
93. Liu Y., Bi T., Wang G. et al. Lupeol inhibits proliferation and induces apoptosis of human pancreatic cancer PCNA-1 cells through AKT/ERK pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharm* 2015;388(3):295–304. DOI: 10.1007/s00210-014-1071-4. PMID: 25418891.
94. Saleem M., Afaq F., Adhami V.M. et al. Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 2004;23(300):5203–14. DOI: 10.1038/sj.onc.120764. PMID: 15122342.
95. Higdon J.V., Delage B., Williams D.E., Dashwood R.H. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharm Res* 2007;55: 224–36. DOI: 10.1016/j.phrs.2007.01.009. PMID: 17317210.
96. Megna B.W., Carney P.R., Nukaya M. et al. Indole-3-carbinol induces tumor cell death: function follows form. *J Surg Res* 2016;204(1):47–54. DOI: 10.1016/j.jss.2016.04.021. PMID: 27451867.
97. Дерягина В.П., Рыжова Н.И. Влияние флавоноидов и индолов на рост аденокарциномы у мышей. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2009;20(1):10–5. [Deryagina V.P., Ryzhova N.I. Effect of flavonoids and indoles on the growth of adenocarcinoma in mice. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina* = *Bulletin RCRC them. N.N. Blokhin RAMS* 2009;20(1):10–5. (In Russ.)].
98. Bunaciu R.P., Yen A. Retinoid chemoprevention: who can benefit? *Curr Pharmacol Rep* 2015;1(6):391–400. DOI: 10.1007/s40495-015-0036-8. PMID: 26539342.
99. Simile M.M., Pagnan G., Pastorino F. et al. Chemopreventive N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (fenretinide) targets deregulated NF-(kappa)B and Mat1A genes in the early stages of rat liver carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005;26(2):417–27. DOI: 10.1093/carcin/bgh315. PMID: 15498786.
100. Rafa H., Benkhelifa S., Younes S.A. et al. All-trans retinoic acid modulates TLR4/NF-kB signaling pathway targeting TNF- $\alpha$  and nitric oxide synthase 2 expression in colonic mucosa during ulcerative colitis and colitis associated cancer. *Mediators Inflamm* 2017;2017:7353252. DOI: 10.1155/2017/7353252. PMID: 28408791.
101. Simeone A.M., Colella S., Krahe R. et al. N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide and nitric oxide pro-drugs exhibit apoptotic and anti-invasive effects against bone metastatic breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2006;27(3):568–77. DOI: 10.1093/carcin/bgi233. PMID: 16199439.
102. Stephenson J.A., Al-Taan O., Arshad A. et al. The multifaceted effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the hallmarks of cancer. *J Lipids* 2013. DOI: 10.1155/2013/261247. PMID: 23762563.
103. Gu Zh., Shan K., Chen H., Chen Y.Q. n-3 polyunsaturated fatty acids and their role in cancer chemoprevention. *Curr Pharmacol Rep* 2015;1(5):283–94. DOI: 10.1007/s40495-015-0043-9. PMID: 26457243.
104. Wink D.A., Vodovoz Y., Laval J. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19(5):711–21. PMID: 9635855.
105. Ohata T., Fukuda K., Takahashi M. et al. Suppression of nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophage cells by omega 3 polyunsaturated fatty acids. *Japan J Cancer Res* 1997;88(3):234–7. PMID: 9140106.
106. Narayanan B.A., Narayanan N.K., Simi B., Reddy B.S. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2003;63(5):972–9. PMID: 12615711.
107. Narayanan B.A., Narayanan N.K., Desai D. et al. Effects of a combination of docosahexaenoic acid and 1,4-phenylene bis (methylene) selenocyanate on cyclooxygenase 2, inducible nitric oxide synthase and beta-catenin pathways in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2004;25(12):2443–9. PMID: 15297372. DOI: 10.1093/carcin/bgh252.
108. Serini S., Calviello G. Modulation of Ras/ERK and phosphoinositide signaling by long-chain n-3 PUFA in breast cancer and their potential complementary role in combination with targeted drugs. *Nutrients* 2017;9(3):185. DOI: 10.3390/nu9030185. PMID: 28241486.
109. Galley H.F., Walker B.E., Howdle P.D., Webster N.R. Regulation of nitric oxide synthase activity in cultured human endothelial cells: effect of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1996;21(1):97–101. PMID: 8791097.
110. Mazhar K., Yang Y., Wang Sh. et al. Role of vitamin E in prevention of human esophageal squamous cell carcinoma: a review. *Sci Lett* 2015;3:89–93.
111. Calvisi D.F., Ladu S., Hironaka K. et al. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH in c-Myc/TGF- $\alpha$  transgenic mouse model of liver cancer. *J Hepatol* 2004;41(5):815–22. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.07.030. PMID: 15519655.
112. Mandl J., Szarka A., Banhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* 2009;157(7):1097–110. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00282.x. PMID: 19508394.
113. Mayland C.R., Bennett M.I., Allan K. Vitamin C deficiency in cancer patients. *Palliat Med* 2005;19:17–20. DOI: 10.1191/0269216305pm9700a. PMID: 15690864.
114. Wu F., Wilson J.X., Tyml K. Ascorbate inhibits iNOS expression and preserves



- vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle of septic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285(1):50–6. DOI: 10.1152/ajpregu.00564.2002. PMID: 12637347.
115. Ichim Th.E., Minev B., Braciak T. et al. Intravenous ascorbic acid to prevent and treat cancer-associated sepsis? *J Transl Med* 2011. DOI: 10.1186/1479-5876-9-25. PMID: 21375761.
116. Li R. Vitamin C, a multi-tasking molecule, find a molecular target in killing cancer cells. *React Oxyg Species (Apex)* 2016;1(2):141–56. DOI: 10.20455/ros.2016.829. PMID: 29780883.
117. Bartsch H., Frank N. Blocking the endogenous formation of N-nitroso compounds and related carcinogens. *IARC Sci Publ* 1996;139:189–201. PMID: 8923031.
118. Жукова Г.Ф., Михайлова М.В. Снижение уровня загрязненности N-нитрозаминами продуктов животного происхождения: обзорная информация. М.: ВНИИТЭИагропром, 1989. 45 с. [Zhukova G.F., Mikhailova M.V. Reducing the level of N-nitrosamine contamination of animal products: survey information. Moscow: VNIITEIаgroпром, 1989. 45 p. (In Russ.)].
119. Дерыгина В.П., Жукова Г.Ф., Власкина С.Г. и др. Влияние селена на образование канцерогенных N-нитрозоаминов. *Вопросы питания* 1996;3:31–3. [Deryagina V.P., Zhukova G.F., Vlaschina S.G. et al. Effect of selenium on the formation of carcinogenic N-nitrosamines. *Voprosy pitaniya = Nutrition Issues* 1996;3:31–3. (In Russ.)].
120. Хотимченко С.А., Жукова Г.Ф., Дерягина В.П., Голубкина Н.А. Ингибирующее действие селена на эндогенный синтез N-нитрозосоединений у крыс. *Вопросы питания* 1997;4:16–8. [Khotimchenko S.A., Zhukova G.F., Deryagina V.P., Golubkina N.A. Inhibitory effect of selenium on the endogenous synthesis of N-nitroso compounds in rats. *Voprosy pitaniya = Nutrition Issues* 1997;4:16–8. (In Russ.)].
121. Bingham S.A., Hughes R., Cross A.J. Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *J Nutr* 2002;132:3522S–5S. DOI: 10.1093/jn/132.11.3522S. PMID: 12421881.
122. Bingham S. Meat, starch and non-starch polysaccharides, are epidemiological and experimental findings consistent with acquired genetic alterations in sporadic colorectal cancer? *Cancer Lett* 1997;114(1, 2):25–34. PMID: 9103247.
123. Lewin M.H., Bailey N., Bandaletova T. et al. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res* 2006;66(3):1859–65. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2237. PMID: 16452248.
124. Hughes R., Pollock J.R., Bingham S. Effect of vegetables, tea and soy on endogenous N-nitrosation, fecal ammonia, and fecal water genotoxicity during a high red meat diet in humans. *Nutr Cancer* 2002;42(1):70–7. DOI: 10.1207/S15327914NC421\_10. PMID: 12235653.
125. Mirvish S.S., Haorah J., Zhou L. et al. Total N-nitroso compounds and their precursors in hot dogs and in the gastrointestinal tract and feces of rats and mice: possible etiologic agents for colon cancer. *J Nutr* 2002;132:3526S–9S. DOI: 10.1093/jn/132.11.3526S. PMID: 12421882.
126. Cross A.J., Greetham H.L., Pollock J.R. et al. Variability in fecal water genotoxicity, determined using the Comet assay, is independent of endogenous N-nitroso compound formation attributed to red meat consumption. *Environ Mol Mutagen* 2006;47(3):179–84. DOI: 10.1002/em.20181. PMID: 16304669.
127. Жукова Г.Ф. Разработка методических подходов гигиенического контроля за содержанием в пищевых продуктах N-нитрозосоединений, изучение закономерностей их образования и способов снижения поступления в организм человека. Дис. ... д-ра биол. наук. М., 1990. 355 с. [Zhukova G.F. Development of methodical approaches of hygienic control over the content of N-nitroso compounds in food products, the study of the patterns of their formation and ways to reduce the entry into the human body. Thesis ... of doctor of biological science. Moscow, 1990. 355 p. (In Russ.)].
128. Myte R., Gylling B., Hågström J. et al. Untangling the role of one-carbon metabolism in colorectal cancer risk: a comprehensive Bayesian network analysis. *Sci Rep* 2017;7:43434. PMID: 28233834. DOI: 10.1038/strep43434.
129. Eizirik D.L., Sandler S., Welsh N. et al. Nicotinamide decreases nitric oxide production and partially protects human pancreatic islets against the suppressive effects of combinations of cytokines. *Autoimmunity* 1994;19(3):193–8. PMID: 7605871.
130. Komatsu S., Yanaka N., Matsubara K. et al. Antitumor effect of vitamin B<sub>6</sub> and its mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2003;1647(1–2):127–30. PMID: 12686121.
131. Robertson M.A., Finochietto P., Gamba C.A. Nicotinamide increases thyroid radiosensitivity by stimulating nitric oxide synthase expression and the generation of organic peroxides. *Horm Metab Res* 2006;38(1):12–5. DOI: 10.1055/s-2006-924966. PMID: 16477534.
132. Petrovic V., Nepal A., Olaisen C. et al. Anti-cancer potential of homemade fresh garlic extract is related to increased endoplasmic reticulum stress. *Nutrients* 2018;10(4):450. DOI: 10.3390/nu10040450. PMID: 29621132.
133. Nishikawa-Ogawa M., Wanibuchi H., Morimura K. et al. N-acetylcysteine and S-methylcysteine inhibit MeIQx rat hepatocarcinogenesis in the post-initiation stage. *Carcinogenesis* 2005;27(5):982–8. DOI: 10.1093/carcin/bgi277. PMID: 16338951.
134. Ansari F.A., Khan A.A., Mahmood R. Protective effect of carnosine and N-acetylcysteine against sodium nitrite-induced oxidative stress and DNA damage in rat intestine. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018;25(20):19380–92. DOI: 10.1007/s11356-018-2133-9. PMID: 29728968.
135. Bruns H., Kazanavicius D., Schultze D. et al. Glycine inhibits angiogenesis in colorectal cancer: role of endothelial cells. *Amino Acids* 2016;48(11):2549–58. DOI: 10.1007/s00726-016-2278-0. PMID: 27351202.
136. Weinberg J.M., Bienholz A., Venkatachalam M.A. The role of glycine in regulated cell death. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(11–12):2285–308. DOI: 10.1007/s00018-016-2201-6. PMID: 27066896.
137. Rose M.L., Cattley R.C., Dunn C. et al. Dietary glycine prevents the development of liver tumors caused by the peroxisome proliferator WY-14,643. *Carcinogenesis* 1999;20(11):2075–81. PMID: 10545408.
138. Amin K., Li J., Chao W.R. et al. Dietary glycine inhibits angiogenesis during wound healing and tumor growth. *Cancer Biol Ther* 2003;2(2):173–8. PMID: 12750558.
139. Maddocks O.D.K., Athineos D., Cheung E.C. et al. Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature* 2017;544(7650):372–6. DOI: 10.1038/nature22056. PMID: 28425994.
140. Lijima K., Shimosegawa T. Involvement of luminal nitric oxide in the pathogenesis of the gastroesophageal reflux disease spectrum. *J Gastroenter Hepatol* 2014;29:898–905. DOI: 10.1111/jgh.12548. PMID: 24863184.
141. Kumagai H., Mukaisho K., Sugihara H. et al. Thioproline inhibits development of esophageal adenocarcinoma induced by gastroduodenal reflux in rats. *Carcinogenesis* 2004;25(5):723–7. DOI: 10.1093/carcin/bgh067. PMID: 14754873.
142. Oyagbemi A.A., Saba A.B., Ibraheem A.O. Curcumin: from Food Spice to cancer prevention. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2009;10:963–7. PMID: 20192567.
143. Siddapa G., Kulsum S., Ravindra D.R. et al. Curcumin and metformin mediated



- chemoprevention of oral cancer is associated with inhibition of cancer stem cells. *Mol Carcinog* 2017;56(11):2446–60. DOI: 10.1002/mc.22692. PMID: 28618017.
144. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Якубовская М.Г. Природные ингибиторы канцерогенеза. Молекулярный канцерогенез. М.: АБВ-пресс, 2016. С. 158–177. [Belitsky G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G. Natural inhibitors of carcinogenesis. In: *Molecular carcinogenesis*. Moscow: ABV-press, 2016. Pp. 158–177. (In Russ.)].
145. Cherdantseva L.A., Potapova O.V., Scarcova T.V. et al. Association of Helicobacter pylori and iNOS production by macrophages and lymphocytes in the gastric mucosa in chronic gastritis. *J Immunol Res* 2014;2014:762514. DOI: 10.1155/2014/762514. PMID: 25309933.
146. Itzkowitz S.H., Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G7–17. DOI: 10.1152/ajpgi.00079.2004. PMID: 15194558.
147. Hussain S.P., He P., Subleski J. et al. Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis. *Cancer Res* 2008;68(17):7130–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0410. PMID: 18757428.
148. Roxburgh C.S.D., McMillan D.C. Cancer and systemic inflammation: treat the tumor and treat the host. *Br J Cancer* 2014;110(6):1409–12. DOI: 10.1038/bjc.2014.90. PMID: 24548867.
149. Vahora H., Khan M.A., Alalami U., Hussain A. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *J Cancer Prevention* 2016;21:1–12. DOI: 10.15430/JCP.2016.21.1.1. PMID: 27051643.
150. Kleinert H., Euchenhofer C., Ihrig-Biedert I., Forstermann U. Glucocorticoids inhibits the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Mol Pharmacol* 1996;49:15–21. PMID: 8569701.
151. Tedeschi E., Menegazzi M., Margotto D. et al. Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(1):254–61. DOI: 10.1124/jpet.103.054460. PMID: 12954801.
152. Galati G., O'Brien P. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004;37:287–303. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034. PMID: 15223063.
153. Suresh D., Srinivasan K. Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. *Indian J Med Research* 2010;131:682–91. PMID: 20516541.
154. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Голубкина Н.А. и др. Экспериментальное изучение профилактических свойств обогащенных селеном растительных продуктов на модели перевиваемых опухолей у мышей. Вопросы биологической, медицинской и фармакологической химии 2011;11:49–55. [Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Golubkina N.A. et al. Experimental study of the preventive properties of plant-enriched selenium products on a model of transplantable tumors in mice. *Voprosy biologicheskoy, mrditsinskoy i farmakologicheskoy = Questions of Biological, Medical and Pharmacological chemistry* 2011;11:49–55. (In Russ.)].
155. Zhou Y., Zheng J., Li Y. et al. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients* 2016;8(8):515. PMID: 27556486. DOI: 10.3390/nu808051.
156. Ляшенко А.А., Мирошниченко И.И., Оганесян Е.А. Повышение системной биодоступности транс-резвератрола с использованием наночастиц. Химико-фармацевтический журнал 2010;2:25–8. [Lyashenko A.A., Miroshnichenko I.I., Oganesyana E.A. Increased systemic bioavailability of trans-resveratrol using nanoparticles. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Chemical Pharmaceutical Journal* 2010;2:25–8. (In Russ.)].
157. Khushnud T., Mousa Sh.A. Potential role of naturally derived polyphenols and their nanotechnology delivery in cancer. *Mol Biotechnol* 2013;55:78–86. DOI: 10.1007/s12033-012-9623-7. PMID: 23371307.
158. Nosrati N., Vacovic M., Paliyath G. Molecular mechanisms and pathways as targets for cancer prevention and progression with dietary compounds. *Int J Mol Sci* 2017;18(10):2050. DOI: 10.3390/ijms18102050. PMID: 28946660.

#### Вклад авторов

В.П. Дерягина: рассмотрение и анализ публикаций по теме обзора, получение и анализ экспериментальных данных, написание текста рукописи;

В.П. Реутов: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

#### Authors' contributions

V.P. Deryagina: consideration and analysis of articles on the subject of the review, experimental data acquisition and analysis, article writing;

V.P. Reutov: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Статья поступила:** 31.01.2019. **Принята к публикации:** 12.03.2019.

**Article received:** 31.01.2019. **Accepted for publication:** 12.03.2019.

# Молекулярно-генетические аспекты внутрипеченочного холангиоцеллюлярного рака: обзор литературы

Б.Н. Гурмиков, Ю.А. Коваленко, В.А. Вишнеvский, А.В. Чжао

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишнеvского» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Большая Серпуховская, 27

**Контакты:** Беслан Нуралиевич Гурмиков [gurmikov@mail.ru](mailto:gurmikov@mail.ru)

Современная концепция как терапии, так и хирургического лечения внутрипеченочного холангиоцеллюлярного рака должна учитывать достижения молекулярной биологии и современные принципы стадирования заболевания. Детальное понимание молекулярных (генетических и эпигенетических) нарушений, лежащих в основе патогенеза холангиокарциномы, позволит улучшить результаты хирургического лечения и расширит возможности персонализированной (таргетной) терапии. Основанное на новых данных о холангиокарциногенезе молекулярное профилирование опухолей желчных протоков может быть наиболее целесообразным для подбора лечения в случаях, рефрактерных к стандартной терапии. Современные потенциальные мишени таргетной терапии включают рецепторы эндотелиального фактора роста, фактора роста фибробластов, MET тирозинкиназы, сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR и мутации изоцитратдегидрогеназы. В обзоре рассматриваются молекулярно-генетические аспекты, лежащие в основе патогенеза, и современные принципы стадирования внутрипеченочного холангиоцеллюлярного рака.

**Ключевые слова:** внутрипеченочный холангиоцеллюлярный рак, молекулярно-генетические аспекты, таргетная терапия, стадирование

**Для цитирования:** Гурмиков Б.Н., Коваленко Ю.А., Вишнеvский В.А., Чжао А.В. Молекулярно-генетические аспекты внутрипеченочного холангиоцеллюлярного рака: обзор литературы. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(1):37–43.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-37-43

## Molecular genetic aspects of intrahepatic cholangiocarcinoma: literature review

B.N. Gurmikov, Yu.A. Kovalenko, V.A. Vishnevsky, A.V. Chzhao

A.V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Ministry of Health of Russia; 27 Bol'shaya Serpukhovskaya St., Moscow 117997 Russia

The modern concept of therapy for intrahepatic cholangiocarcinoma including surgical treatment, must take into account the achievements of molecular biology and modern staging principles. A detailed understanding of the molecular genetic (genetic and epigenetic) disorders underlying the pathogenesis of cholangiocarcinoma is important, which will improve the results of surgical treatment and expand the possibilities of personalized (targeted) therapy. Based on new data on cholangiocarcinogenesis, molecular profiling of bile duct tumors may be most appropriate for the selection of treatment in cases refractory to standard therapy. Current potential target therapy targets include endothelial growth factor receptors, fibroblast growth factor, MET tyrosine kinase, PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and isocitrate dehydrogenase mutation. The review considers the molecular-genetic aspects underlying the pathogenesis and modern principles of staging intrahepatic cholangiocarcinoma.

**Key words:** intrahepatic cholangiocarcinoma, molecular genetic aspects, targeted therapy, staging

**For citation:** Gurmikov B.N., Kovalenko Yu.A., Vishnevsky V.A., Chzhao A.V. Molecular genetic aspects of intrahepatic cholangiocarcinoma: literature review. *Uspekhii molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):37–43.

Внутрипеченочный холангиоцеллюлярный рак (ВПХЦР) – агрессивная злокачественная опухоль с высокой летальностью и риском развития рецидива заболевания после радикального хирургического лечения [1, 2]. Особенностью данной опухоли является длительное бессимптомное течение, вследствие чего на момент обращения выявляются распространенные формы заболевания с региональными и отдаленными метастазами [3]. Современная концепция терапии злокачественных новообразований учитывает успехи мо-

лекулярной биологии, в том числе и при планировании хирургического вмешательства. К сожалению, при холангиоцеллюлярном раке (ХЦР) существующие общепринятые схемы терапии обладают недостаточной эффективностью [2]. Поэтому важное значение имеет детальное понимание молекулярно-генетических нарушений, лежащих в основе патогенеза холангиокарциномы, позволяющее улучшить результаты хирургического лечения и расширить возможности персонализированной терапии ВПХЦР.

### Молекулярно-генетические аспекты холангиокарциногенеза

Процесс холангиокарциногенеза запускается воздействием таких медиаторов воспаления, как цитокины, факторы роста опухоли, тирозинкиназы и желчные кислоты, которые нарушают клеточную пролиферацию, регуляцию клеточного цикла, а также угнетают апоптоз [4]. Некоторые медиаторы воспаления через активацию NO-синтазы способствуют образованию избыточного количества оксида. Последний обладает цитотоксическим эффектом и, являясь высокореакционноспособным радикалом, взаимодействует с компонентами различных биологических мембран, а также повреждает структуру ДНК вследствие ее дезаминирования. Кроме этого, оксид азота угнетает активность рибонуклеотидредуктазы – фермента, восстанавливающего гидроксил при С2 рибозы, и таким образом, обеспечивающего необходимый пул нуклеозидтрифосфатов для репарации ДНК [5]. На дальнейшее выживание клеток с поврежденной ДНК влияет медиатор воспаления – интерлейкин 6 (IL-6), секретируемый стромальным клеточным окружением, увеличивающий пролиферативную активность [6]. В дальнейшем IL-6 активирует MCL1 (ингибитор апоптоза), связанный с активацией транскрипции STAT (signal transducer and activator of transcription) и протеинкиназы B (Akt). В свою очередь, транскрипция MCL1 активирует IL-6 в сигнальном пути MAPK. IL-6 активирует киназы JAK1 и JAK2, а через них – STAT3 [7]. Активируется воспалительный сигнальный путь, что приводит к некоторому снижению апоптоза – важнейшего процесса, направленного на уничтожение клетки с поврежденной ДНК. Таким образом, хронический воспалительный процесс индуцирует через медиаторы воспаления пролиферацию клеток, повреждение структуры ДНК и угнетение апоптоза, которые в комплексе приводят к трансформации нормальной клетки в опухолевую [8].

В эмбриогенезе билиарного тракта ключевую роль играют сигнальные пути, нарушение регуляции которых ассоциировано с онкогенезом ХЦП. Такими сигнальными путями являются Notch и Hedgehog. Активация сигнального пути Notch способствует переходу нормальных гепатоцитов в билиарные клетки-предшественники ВПХЦП. Экспериментально показано, что гиперэкспрессия Notch 1 ведет к развитию ВПХЦП, а ингибитор  $\gamma$ -секретазы, расщепляющей Notch, подавляет онкогенез [8, 9]. Также нарушения сигнального пути Hedgehog ассоциированы с развитием ХЦП. Ингибирование Hedgehog циклопамином тормозит миграцию, пролиферацию и снижает инвазивность клеток ХЦП [8, 10].

Сигнальный путь Wnt также участвует в развитии внутрипеченочных желчных путей [11]. Известно, что путь Wnt высокоактивирован при ХЦП. Ингибирование передачи сигналов Wnt с помощью ингибиторов Wnt в моделях мышей и крыс заметно снижает пролиферацию холангиокарциномы и увеличивает

апоптоз, что приводит к регрессии опухоли [12]. Кроме этого, установлена роль сигнального пути p44/42 MAPK, который запускается активацией эпидермального фактора роста (EGFR). Роль последнего как индуктора развития опухоли из билиарного эпителия при развитии ХЦП также установлена в экспериментальных работах [13].

Нарушение регуляции сигнального пути PI3K/PTEN/Akt/mTOR играет ключевую роль в патогенезе ВПХЦП. Снижение экспрессии PTEN является независимым предиктором низкой общей выживаемости больных ВПХЦП в послеоперационном периоде [14].

При изучении патогенеза ВПХЦП исследуются механизмы, связанные с генетическими нарушениями. В работах ряда авторов изучалось влияние хромосомных aberrаций (дупликации, делеции, амплификации), генетических и эпигенетических нарушений в генах-супрессорах и онкогенах. При исследовании образцов опухолевой ткани 98 пациентов с ВПХЦП выявлены хромосомные делеции 1p, 4q, 8p, 9p, 17p и 18q и дупликации на 5p, 7p, 8q, 17q и 20q [8, 15]. Немаловажную роль в холангиокарциногенезе играет нарушение регуляции клеточного цикла и апоптоза: по данным исследования опухолевой ДНК у 229 пациентов с ХЦП, мутации TP53 встречались в 21 % случаев [8, 16].

Частота встречаемости мутаций KRAS выше для дистальных форм ХЦП, чем для ВПХЦП (40 и 9–24 % соответственно). Тем не менее это одно из самых распространенных генетических нарушений при ВПХЦП [17].

Доказана ассоциация соматических мутаций в генах, кодирующих изоцитратдегидрогеназы 1 и 2 (IDH1 и IDH2) с развитием ХЦП. Мутации IDH встречаются в 28 % случаев ВПХЦП. Нарушения этих генов ассоциированы с повышением количества мутаций в гене TP53 и гиперметилированием ДНК [8, 18]. Ингибиторы IDH изучаются в целях таргетной терапии ХЦП. При выявлении мутации гена IDH у пациентов после проведенного хирургического лечения 3-летняя выживаемость достоверно ниже (33 % против 81 %). Кроме этого, мутации IDH чаще выявляются у пациентов с ВПХЦП по сравнению с внепеченочными ХЦП (28 и 7 % соответственно) [19].

### Эпигенетические нарушения при внутрипеченочном холангиоцеллюлярном раке

В последнее время в работах зарубежных авторов большое внимание уделяется эпигенетическим нарушениям при ВПХЦП, в частности гиперметилированию ДНК и модификациям гистонов, которые участвуют в регуляции экспрессии генов. Следует отметить, что гиперметилирование ДНК может быть индуцировано хроническим воспалительным процессом [20].

Снижение экспрессии генов-супрессоров при гиперметилировании ДНК ассоциировано с повышением нестабильности ДНК. Гиперметилирование ДНК, наблюдаемое при ВПХЦП, приводит к снижению

экспрессии генов-супрессоров: *CDKN2* (83 % случаев ХЦП), *SOCS3* (62 %), *RASSF1A* (69 %) и *APC* (47 %) [16]. В работе Т. Накаока и соавт. сообщается, что при гиперметилировании происходит подавление экспрессии генов *MHL1*, *p14*, *DARK* (death-associated protein kinase). Указанные изменения ассоциированы с ХЦП. К генам, наиболее часто подвергающимся метилированию при ВПХЦП, относятся *CCDN2*, *CDY13*, *GRIN2B*, *RUNX3*, *TWIST1*. В работах вышеуказанных авторов также сообщается об эффективности эпигенетической терапии препаратами, ингибирующими метилирование ДНК, у пациентов с ХЦП [21].

В нескольких исследованиях показано, что гиперметилирование ДНК в промоторной области гена *MLH1*, участвующего в процессах репарации ДНК, связано с неблагоприятным прогнозом пациентов с холангиокарциномой [22].

Х. Ф. Liu и соавт. продемонстрировали, что подавление транскрипции гена *DAPK* путем гиперметилирования ДНК приводит к снижению активности апоптоза [23].

Эпигенетические изменения, такие как метилирование ДНК, регулируют не только белоккодирующие гены, но также кодирующие микроРНК [20]. Последние могут взаимодействовать с матричной РНК различных генов-мишеней как онкогенов, так и супрессоров опухолевого роста, и участвовать в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии этих генов путем РНК-интерференции. В работах разных авторов показано, что экспрессия miR-370 инактивируется ДНК-метилированием в клетках холангиокарциномы [24, 25]. МикроРНК играют важную роль в клеточной пролиферации, апоптозе и дифференцировке клеток.

Эпигенетические лекарственные препараты, такие как ингибиторы метилирования ДНК и ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), являются перспективными для лечения ХЦП. В нескольких исследованиях изучалась эффективность ингибиторов ДНК-метилирования. Зебуларин обладает противоопухолевым действием при холангиокарциноме благодаря ингибированию ДНК-метилтрансфераз [26]. Главный недостаток таких препаратов — неспецифичность их действия, поэтому продолжается поиск препаратов, которые бы более избирательно метилировали CpG-островки в промоторах генов-супрессоров. Ожидается, что такие препараты позволят уменьшить побочные эффекты эпигенетической терапии ХЦП [27].

В процессе холангиокарциногенеза немаловажную роль играют **стромы и опухолевое микроокружение**. ВПХЦП характеризуется повышенным содержанием в стромальной ткани опухолеассоциированных фибробластов, способствующих прогрессированию опухолевого процесса [28].

Детальные механизмы взаимодействия опухоли и стромы до конца не изучены. С учетом влияния стромы на прогрессирование ХЦП важное значение

имеет перспектива поиска таргетного воздействия на опухолеассоциированные фибробласты.

### Молекулярное профилирование опухолей желчных путей и таргетная терапия

С учетом ограниченной эффективности традиционной химиотерапии в отношении нерезектабельных форм ВПХЦП интерес представляет поиск новых методов лечения. В свою очередь, использование методов высокопроизводительного секвенирования нового поколения позволяет расширить представления о патогенезе ВПХЦП и определить ключевые молекулярные мишени для таргетной терапии [2].

Основанное на новых данных о холангиокарциногенезе молекулярное профилирование опухолей желчных протоков может быть наиболее целесообразным для подбора лечения в случаях, рефрактерных к стандартной терапии.

**EGFR-ингибиторы.** Рецепторы EGFR (EGFR; ErbB-1; HER1) входят в группу семейства тирозинкиназ. Активируясь в результате точечной мутации, EGFR запускает каскад нескольких сигнальных путей (в частности, RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT). Эти сигнальные пути играют важную роль в регуляции дифференцировки клеток, пролиферации, миграции и ангиогенеза. Гиперэкспрессия EGFR встречается у 10–32 % пациентов с внутривенной холангиокарциномой [29]. Результаты нескольких доклинических исследований продемонстрировали, что ингибирование мутантного EGFR позволяет эффективно подавлять рост клеток и индуцировать апоптоз клеток с данной мутацией [30]. Результаты клинических испытаний II фазы также продемонстрировали эффективность анти-EGFR-терапии такими препаратами, как цетуксимаб (моноклональные антитела к внеклеточному домену EGFR) и эрлотиниб (ингибитор тирозинкиназного домена EGFR) отдельно или в сочетании с гемцитабином и оксалиплатином (GEMOX) в терапии пациентов с прогрессирующим раком желчных протоков [31]. По данным J. Lee и соавт., в исследовании III фазы при анализе подгруппы из 84 пациентов с ХЦП добавление эрлотиниба к химиотерапии сопровождалось увеличением безрецидивной выживаемости (5,9 мес) [32].

**Ингибиторы FGFR2.** Трансмембранные рецепторные тирозинкиназы семейства рецептора фактора роста фибробластов (FGFR) участвуют в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, миграции и выживания клеток. FGFR2 является членом семейства FGFR (FGFR1–4), его геномные aberrации выявляются у пациентов с ВПХЦП с частотой 3–50 % [33]. Выявление роли FGFR-сигнализации в патогенезе ВПХЦП открыло новые возможности для таргетной терапии заболевания с применением FGFR-селективных и FGFR-неселективных ингибиторов, а также моноклональных антител к FGFR2.



В доклиническом исследовании S. Rizvi и соавт. сообщили, что ингибирование FGFR препаратом BGJ398 индуцировало гибель клеточных линий ВПХЦР и значительно снижало прогрессию опухоли в мышинных моделях и ксенографтах ВПХЦР [34]. M.J. Vora и соавт. использовали понатиниб, неселективный FGFR-ингибитор, при лечении 2 пациентов с прогрессирующим ВПХЦР после системной химиотерапии. У 1-го пациента с хромосомной перестройкой, которая привела к образованию слитного белка FGFR2-MGEA5, лечение с помощью понатиниба способствовало снижению сывороточного уровня антигена 19-9 (CA 19-9) и индуцировало некроз опухоли. У 2-го пациента с химерным геном *FGFR2-TACC3* терапия понатинибом привела к стабилизации заболевания [35].

По данным J.C. Soria и соавт., результаты клинических исследований I фазы свидетельствуют о потенциальной эффективности анти-FGFR-терапии при мутациях генов *FGFR1-3*. Частота объективного эффективного ответа составила 27 %, а отсутствие прогрессирования заболевания было достигнуто у 60 % пациентов [36].

В настоящее время проходят исследования II фазы понатиниба в лечении пациентов с прогрессирующими формами холангиокарцином с выявленными генетическими aberrациями FGFR.

#### **Ингибиторы пути передачи сигналов HGF/MET.**

Рецептор фактора роста гепатоцитов (HGF) MET представляет собой тирозинкиназный рецептор, гиперэкспрессия которого, по данным разных авторов, определяется в 12–58 % опухолей (ВПХЦР). MET активируется лигандом HGF, который индуцирует MET-киназу и запускает ряд процессов, обеспечивающих инвазивный рост опухоли [37].

Существует несколько молекулярных мишеней для прерывания пути HGF/MET, включая ингибирование взаимодействия между HGF и MET-рецептором, прямое ингибирование MET-тирозинкиназы. Разработка ингибиторов MET все еще находится на ранней стадии. Новый препарат LY2801653 ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеточных линий холангиокарциномы, а также подавляет рост опухолей ксенотрансплантата [38]. В I фазе клинических испытаний участвовали 73 пациента с солидными опухолями, и полученные результаты свидетельствовали о хорошей переносимости и безопасности его комбинации с тивантинибом (с-MET ингибитор) и гемцитабином. В этом исследовании у 26 (46 %) пациентов продемонстрирована стабилизация заболевания [39].

**Ингибиторы IDH.** Фермент IDH участвует в цикле Кребса, катализирует превращение изоцитрата в  $\alpha$ -кетоглутарат. Мутации *IDH* усиливают образование 2-гидроксиглутарата (2-HG) из  $\alpha$ -кетоглутарата, что ассоциировано с более высоким метилированием ДНК и, в свою очередь, способствует клеточной пролиферации, инвазии, выживанию и неоангиогенезу. Мутации 2 генов семейства, *IDH1* и *IDH2*, идентифицированы у 15–22 % пациентов с ВПХЦР. Для ВПХЦР с мута-

цией *IDH1/2* результаты клинических исследований I фазы свидетельствуют о потенциальной эффективности анти-IDH-терапии (препараты AGI-5198 и AGI-6780). Частота ответа на терапию составила 6 %, а стабилизация заболевания – 56 %, 6-месячная выживаемость без рецидива – 40 % [40].

**Ингибиторы ROS1.** ROS1 представляет собой рецепторную тирозинкиназу, кодируемую геном *ROS1*. Транслокация гена *ROS1* обнаруживается у 1–9 % пациентов с ВПХЦР [41]. Онкогенная роль химерных белков, образованных с участием ROS1, подтверждается данными исследований, демонстрирующими усиление холангиокарциногенеза на экспериментальных мышинных моделях. В доклинических исследованиях форетиниб ингибировал холангиокарциногенез, ассоциированный с транслокациями FIG-ROS. Этот препарат продемонстрировал клиническую эффективность при установленной резистентности к другому ингибитору ROS1 – кризотинибу [42].

**Ингибиторы пути передачи сигналов PI3K/PTEN/Akt/mTOR.** PI3K/Akt/mTOR – внутриклеточные сигнальные пути, приводящие к активации нескольких тирозинкиназ, включая EGFR, HER2 и MET.

PTEN является естественным ингибитором этих путей. Нарушение регуляции пути PI3K способствует развитию опухоли, пролиферации и выживаемости клеток, повышению инвазивности опухоли и неоангиогенеза. Активация этого сигнального пути также может играть ключевую роль в патогенезе ВПХЦР [43]. F. Ewald и соавт. сообщают об эффективности ингибитора mTOR (RAD001) в подавлении пролиферации клеточных линий ХЦР [44]. В этом исследовании ингибирование Akt препаратом МК-2206 дополнительно усиливало эффект ингибирования mTOR как *in vitro*, так и в экспериментальных моделях на животных. Кроме этого, синергическая противоопухолевая активность двойного ингибирования путей PI3K/mTOR и HSP90, а также путей PI3K/Akt/mTOR и RAF/MEK/ERK доказана в доклинических исследованиях для ХЦР. В I фазе клинического исследования В.А. Costello и соавт. продемонстрировали эффективность эверолимуса (ингибитора mTOR) в сочетании с гемцитабином и цисплатином для пациентов с ХЦР, устойчивым к химиотерапии [45].

**Ингибиторы RAS/RAF/MEK/ERK.** Сигнальный путь RAS/RAF/MEK/ERK, также известный как путь MAPK/ERK, играет важную роль в регуляции дифференцировки, миграции и инвазии клеток. Каскад MAPK/ERK часто активирован при ХЦР, что может быть использовано в таргетной терапии. К сожалению, попытки прямого ингибирования мутантного RAS пока не дали значимых результатов, поэтому в последнее время усилия сосредоточены на непрямых способах блокирования активности RAS и регулируемых им компонентов данного сигнального каскада [46].

**JAK/STAT-ингибиторы.** Роль нарушения сигнального пути IL-6/JAK/STAT в патогенезе ВПХЦР

доказана. Взаимодействие IL-6 с рецепторами gp130 индуцирует фосфорилирование связанных с gp130 JAK-киназ (JAK1, JAK2 и TYK2) с последующей активацией STAT3 и экспрессией MCL1. Активация сигнального пути JAK/STAT выявлена в 50 % случаев ВПХЦР. Следовательно, компоненты IL-6/JAK/STAT-пути могут рассматриваться в качестве мишеней для молекулярно направленной терапии. Однако возможность применения антител к IL-6 в терапии ВПХЦР нуждается в дальнейшем изучении [47].

Результаты данных исследований демонстрируют потенциал индивидуализированного подхода к терапии злокачественных опухолей на основе данных молекулярного профилирования опухолевой ткани.

### **Влияние данных о молекулярно-биологических особенностях внутрипеченочного холангиоцеллюлярного рака на современный подход к стадированию заболевания**

В 2017 г. Американский объединенный комитет по изучению рака (AJCC) пересмотрел существующую систему классификации TNM и была издана ее 8-я редакция. В новом издании классификации перидуктальная инвазия исключена как прогностический фактор, в то же время новым параметром стадирования является размер опухоли (>5 см или <5 см) [48].

При стадировании заболевания, кроме клинико-анатомических характеристик, учитываются также данные об особенностях ВПХЦР, полученные на основе генетического профилирования и молекулярно-биологических исследований. В частности, учитывается наличие в опухоли мутации *FGFR2*.

### **Заключение**

Внутрипеченочный холангиоцеллюлярный рак — крайне агрессивная злокачественная опухоль, ее лечение должно быть комплексным с учетом молекулярно-биологических особенностей. Исходя из этого перспективным является молекулярно-генетическое исследование опухоли (высокопроизводительное секвенирование (NGS), флуоресцентная гибридизация *in situ*) в целях выявления различных генетических мутаций. Результаты этих исследований должны быть учтены при диагностике, стадировании и составлении схемы лечения пациентов с ВПХЦР. Эти исследования позволят выявить возможные мишени (специфические мутации) для персонализированной таргетной терапии. В настоящее время потенциальные мишени для таргетной терапии включают рецептор MET тирозинкиназы, сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR и мутации *IDH*.

Особый интерес представляют поиски новых методов ранней диагностики ВПХЦР, эффективного сочетания хирургии и химиотерапии. Таким образом, с учетом существующих в настоящее время неудовлетворительных результатов хирургического лечения ВПХЦР актуальным остается проведение исследований по поиску новых эффективных биомаркеров ранней диагностики (скрининга) заболевания, а также молекулярно-генетических маркеров эффективности хирургического лечения ВПХЦР и новых эффективных таргетных препаратов. Проблему лечения резектабельного ВПХЦР следует решать сочетанием хирургического лечения и таргетной терапии, основанной на результатах молекулярно-генетического профилирования опухоли.

## **ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES**

1. Гришечкина И.А., Викторова И.А., Трухан Д.И., Кондратьева Н.А. Актуальные аспекты диагностики внутрипеченочной холангиокарциномы. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований* 2016;11(1):61–5. [Grishechkina I.A., Viktorova I.A., Trukhan D.I., Kondratyeva N.A. Actual aspects of diagnostics of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research* 2016;11(1):61–5. (In Russ.)].
2. Rahnamai-Azar A.A., Weisbrod A.B., Dillhoff M. et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: current management and emerging therapies. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;11(5):439–49. DOI: 10.1080/17474124.2017.1309290. PMID:28317403.
3. Buettner S., van Vugt J., Ijzermans J.N., Groot Koerkamp B. Intrahepatic cholangiocarcinoma: current perspectives. *Onco Targets Ther* 2017;10:1131–42. DOI: 10.2147/OTT.S93629. PMID: 28260927.
4. Blechacz B.G., Feldman G.J. Tumors of the bile ducts, gallbladder, and ampulla. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease* 2010;1:1171–6. DOI: <https://doi.org/10.4143/crt.2015.497>. PMID: 24140396.
5. Jaiswal M., LaRusso N.F., Burgart L.J., Gores G.J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res* 2000;60(1):184–90. PMID: 10646872.
6. Park J., Tadlock L., Gores G.J., Patel T. Inhibition of interleukin 6-mediated mitogen-activated protein kinase activation attenuates growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* 1999;30:1128–33. DOI: 10.1002/hep.510300522. PMID: 10534331.
7. Isomoto H., Kobayashi S., Werneburg N.W. et al. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2005;42(6):1329–38. DOI:10.1002/hep.20966. PMID: 10534331.
8. Ротин Д.Л. Холангиоцеллюлярная карцинома сегодня. Литературный аналитический обзор. *Злокачественные опухоли* 2015;3(14):3–16. DOI: 10.18027/2224-5057-2015-3-3-16. [Rotin D.L. Cholangiocarcinoma today. Literary analytical review. *Zlokachestvennyye opukhohli = Malignant tumors* 2015;3(14):3–16. (In Russ.)].
9. Zender S., Nickeleit I., Wuestefeld T. et al. A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. *Cancer Cell* 2013;23(6):784–95. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.04.019. PMID: 23727022.
10. Jinawath A., Akiyama Y., Sriya B., Yuasa Y. Dual blockade of the Hedgehog

- and ERK1/2 pathways coordinately decreases proliferation and survival of cholangiocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:271–8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-006-0166-9>. PMID: 17294242.
11. Sirica A.E., Nathanson M.H., Gores G.J., Larusso N.F. Pathobiology of biliary epithelia and cholangiocarcinoma: proceedings of the Henry M. and Lillian Stratton Basic Research Single-Topic-Conference. *Hepatology* 2008;48(6):2040–6. DOI: 10.1002/hep.22623. PMID: 18855901.
  12. Boulter L., Guest R.V., Kendall T.J. et al. WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited. *J Clin Invest* 2015;125(3):1269–85. DOI: 10.1172/JCI76452. PMID: 25689248.
  13. Kiguchi K., Carbajal S., Chan K. et al. Constitutive expression of ErbB-2 in gallbladder epithelium results in development of adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61(19):6971–6. PMID:11585718.
  14. Chen M.H., Chiang K.C., Cheng C.T. et al. Antitumor activity of the combination of an HSP90 inhibitor and a PI3K/mTOR dual inhibitor against cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 2014;5(9):2372–89. DOI: 10.18632/oncotarget.1706. PMID: 24796583.
  15. Ghouri Y.A., Mian I., Blechacz B. Cancer review: cholangiocarcinoma. *J Carcinog* 2015;14:1. DOI: 10.4103/1477-3163.151940. PMID: 25788866.
  16. Sia D., Tovar V., Moeini A., Llovet J.M. Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. *Oncogene* 2013;32(41):4861–70. DOI: 10.1038/ncr.2012.617. PMID: 23318457.
  17. Xu R.F., Sun J.P., Zhang S.R. et al. KRAS and PIK3CA but not BRAF genes are frequently mutated in Chinese cholangiocarcinoma patients. *Biomed Pharmacother* 2011;65(1):22–6. DOI: 10.1016/j.biopha.2010.06.009. PMID: 21051183.
  18. Borger D.R., Tanabe K.K., Fan K.C. et al. Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad based tumor genotyping. *Oncologist* 2012;17:72–9. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0386. PMID: 22180306.
  19. Kipp B.R., Voss J.S., Kerr S.E. et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2012;43:1552–8. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.12.007. PMID: 22503487.
  20. Oishi N., Kumar M.R., Roessler S. et al. Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2012;56(5):1792–803. DOI: 10.1002/hep.25890. PMID: 22707408.
  21. Nakaoka T., Saito Y., Saito H. Aberrant DNA methylation as a biomarker and therapeutic target of cholangiocarcinoma. *Int J Mol Sci* 2017;18(6):1111. DOI: 10.3390/ijms18061111. PMID: 28545228.
  22. Limpiboon T., Khaenam, P., Chinnasri P. et al. Promoter hypermethylation is a major event of hMLH1 gene inactivation in liver fluke related cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2005;217:213–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.06.020. PMID: 15617839.
  23. Liu X.F., Kong F.M., Xu Z. et al. Promoter hypermethylation of death-associated protein kinase gene in cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007;6:407–11. PMID: 17690039.
  24. Meng F., Wehbe-Janeck H., Henson R. et al. Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. *Oncogene* 2008;27:378–86. DOI: 10.1038/sj.onc.1210648. PMID: 17621267.
  25. Pan X.P., Huang L.H., Wang X. MiR-370 functions as prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(16):3581–5. PMID: 28925487.
  26. Hibino S., Saito Y., Muramatsu T. et al. Inhibitors of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) activate tumor-suppressor microRNAs in human cancer cells. *Oncogenesis* 2014;3:104. DOI: 10.1038/ncsis.2014.17. PMID: 24861464.
  27. Uhm K.O., Lee E.S., Lee Y.M. et al. Aberrant promoter CpG islands methylation of tumor suppressor genes in cholangiocarcinoma. *Oncol Res* 2008;17(4):151–7. PMID:18773859.
  28. Sirica A.E. The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9(1):44–54. DOI: 10.1038/nrgastro.2011.222. PMID: 22143274.
  29. Sirica A.E. Role of ErbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008;14(46):7033–58. PMID: 19084911.
  30. Zhang Z., Oyesanya R.A., Campbell D.J. et al. Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ErbB1) and ErbB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy. *Hepatology* 2010;52(3):975–86. DOI: 10.1002/hep.23773. PMID: 20607690.
  31. Gruenberger B., Schueller J., Heubrandtner U. et al. Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study. *Lancet Oncol* 2010;11(12):1142–8. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70247-3. PMID: 21071270.
  32. Lee J., Park S.H., Chang H.M. et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2012;13(2):181–8. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70301-1. PMID: 22192731.
  33. Moeini A., Sia D., Bardeesy N. et al. Molecular pathogenesis and targeted therapies for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2016;22(2):291–300. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3296. PMID: 26405193.
  34. Rizvi S., Khan S.H., Hallemeier Ch.L. et al. Cholangiocarcinoma – evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(2):95–111. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.157. PMID: 28994423.
  35. Borad M.J., Champion M.D., Egan J.B. et al. Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS Genet* 2014;10(2):e1004135. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004135. PMID: 24550739.
  36. Soria J.C., Ohe Y., Vansteenkiste J. et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018;378:113–25. DOI: 10.1056/NEJMoa1713137. PMID: 29151359.
  37. Miyamoto M., Ojima H., Iwasaki M. et al. Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2011;105(1):131–8. DOI: 10.1038/bjc.2011.199. PMID: 21673683.
  38. Barat S., Bozko P., Chen X. et al. Targeting c-MET by LY2801653 for treatment of cholangiocarcinoma. *Mol Carcinog* 2016;55(12):2037–50. DOI: 10.1002/mc.22449. PMID: 26757360.
  39. Pant S., Saleh M., Bendell J. et al. A phase I dose escalation study of oral c-MET inhibitor tivantinib (ARQ 197) in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. *Ann Oncol* 2014;25(7):1416–21. DOI: 10.1093/annonc/mdu157. PMID: 24737778.
  40. Wang P., Dong Q., Zhang C. et al. Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene* 2013;32(25):3091–100. DOI: 10.1038/ncr.2012.315. PMID: 22824796.
  41. Lim S.M., Yoo J.E., Lim K.H. et al. Rare Incidence of ROS1 Rearrangement in Cholangiocarcinoma.

- Cancer Res Treat 2016;49(1):185–92. DOI: <https://doi.org/10.4143/crt.2015.497>. PMID: 27121721.
42. Davare M.A., Saborowski A., Eide C.A. et al. Foretinib is a potent inhibitor of oncogenic ROS1 fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(48):19519–24. DOI: 10.1073/pnas.1319583110. PMID: 24218589.
43. Xie D., Ren Z., Fan J., Gao Q. Genetic profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical implication in targeted therapy. *Am J Cancer Res* 2016;6(3):577–86. PMID: 27152236.
44. Ewald F., Grabinski N., Grottko A. et al. Combined targeting of AKT and mTOR using MK-2206 and RAD001 is synergistic in the treatment of cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* 2013;133(9):2065–76. DOI: 10.1002/ijc.28214. PMID: 23588885.
45. Costello B.A., Borad M.J., Qi Y. et al. Phase I trial of everolimus, gemcitabine and cisplatin in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* 2014;32(4):710–6. DOI: 10.1007/s10637-014-0096-3. PMID: 24740268.
46. Marcus K., Mattos C. Direct Attack on RAS: intramolecular communication and mutation-specific effects. *Clin Cancer Res* 2015;21(8):1810–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2148. PMID: 25878362.
47. Sia D., Hoshida Y., Villanueva A. et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology* 2013;144(4):829–40. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.001. PMID: 23295441.
48. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch. *TNM classification of malignant tumours. Eighth Edition.* 2017. Available at: <http://www.hoofdhalskanker.info/wpavl/wp-content/uploads/TNM-Classification-of-Malignant-Tumours-8th-edition.pdf>.

#### Вклад авторов

Б. Н. Гурмиков: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;  
 Ю. А. Коваленко: обзор публикаций по теме статьи;  
 В. А. Вишневецкий: обзор публикации по теме статьи, редактирование текста рукописи;  
 А. В. Чжао: разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи.

#### Authors' contributions

B.N. Gurmikov: reviewing of publications of the article's theme, article writing;  
 Yu.A. Kovalenko: reviewing of publications of the article's theme;  
 V.A. Vishnevsky: reviewing of publications of the article's theme, article editing;  
 A.V. Chzhao: developing the research design, article editing.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Б. Н. Гурмиков/B.N. Gurmikov: <https://orcid.org/0000-0001-5958-3608>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Статья поступила:** 30.07.2018. **Принята к публикации:** 12.03.2019.

**Article received:** 30.07.2018. **Accepted for publication:** 12.03.2019.



# Связь молекулярных маркеров с эффективностью и временем ответа на андрогендепривационную терапию у больных раком предстательной железы

Л. В. Спирина<sup>1,2</sup>, А. К. Горбунов<sup>1</sup>, И. В. Кондакова<sup>1</sup>, Е. А. Усынин<sup>1</sup>, Е. М. Слонимская<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;  
Россия, 634009 Томск, Кооперативный переулок, 5;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск,  
Московский тракт, 2

**Контакты:** Людмила Викторовна Спирина spirinalvl@mail.ru

Ожидаемый эффект от андрогендепривационной терапии является одним из важных критериев при выборе тактики лечения пациентов с раком предстательной железы. Не менее значимый фактор — время его реализации. В исследовании показано, что высокая экспрессия в ткани опухоли андрогеновых рецепторов (AR) на фоне низкой экспрессии эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) характерна для пациентов, у которых эффект от проводимой андрогендепривационной терапии отмечался в течение 12 мес. Выявлена совокупность параметров, позволяющих спрогнозировать продолжительность ответа на андрогендепривационную терапию у больных раком предстательной железы, к которым относят возраст пациента, уровни тестостерона, простатического специфического антигена, уровень экспрессии AR, ER $\alpha$  в опухоли. Эти данные позволяют рассматривать эти факторы в качестве дополнительных информативных маркеров для прогнозирования не только ожидаемого эффекта, но и его продолжительности.

**Ключевые слова:** рак предстательной железы, AR, ER, тестостерон, простатический специфический антиген, андрогендепривационная терапия

**Для цитирования:** Спирина Л. В., Горбунов А. К., Кондакова И. В. и др. Связь молекулярных маркеров с эффективностью и временем ответа на андрогендепривационную терапию у больных раком предстательной железы. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(1):44–8.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-44-48

## Association between the molecular markers, effect and time of response to the androgen-deprivation therapy in patients with prostate cancer

L. V. Spirina<sup>1,2</sup>, A. K. Gorbunov<sup>1</sup>, I. V. Kondakova<sup>1</sup>, E. A. Usynin<sup>1</sup>, E. M. Slonimskaya<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;  
5 Kooperativny Pereulok, Tomsk 634050, Russia;

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovskiy Trakt, Tomsk 634050, Russia

The expected effect of androgen-deprivation therapy is one of the important criteria when choosing therapy in patients with prostate cancer. No less significant factor is the time of its implementation. The study showed that high expression of androgen receptors (AR) in the tumor tissue against the background of low estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) expression is characteristic of patients in whom the effect of androgen-deprivation therapy was observed for 12 months. A set of parameters has been identified that makes it possible to predict the duration of response to androgen-deprivation therapy in patients with prostate cancer, which include the patient's age, testosterone level, prostate specific antigen, expression level of AR, ER $\alpha$ . These data allow us to consider these parameters as additional informative markers, to predict not only the expected effect, but also its duration.

**Key words:** prostate cancer, AR, ER, testosterone, prostate specific antigen, androgen-deprivation therapy

**For citation:** Spirina L. V., Gorbunov A. K., Kondakova I. V. et al. Association between the molecular markers, effect and time of response to the androgen-deprivation therapy in patients with prostate cancer. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2019;6(1):44–8.

### Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) — одна из актуальных проблем современной онкологии. Это обусловлено высокими показателями прироста заболеваемости и отсутствием персонифицированных подходов

к лечению, а соответственно, его недостаточной эффективностью. Согласно современным рекомендациям андрогендепривационная терапия (АДТ) является стандартом в лечении пациентов с местно-распространенным и метастатическим РПЖ. Ответ опухоли

на проводимую терапию регистрируется более чем у 90 % пациентов. Однако длительность ответа составляет в среднем 12–36 мес, в дальнейшем происходят прогрессирование опухолевого процесса и развитие кастрационно-резистентной формы заболевания [1, 2].

На сегодняшний день РПЖ представляет собой гетерогенную группу опухолей, развитие которых может характеризоваться активацией как андрогензависимых, так и андрогеннезависимых путей. Андрогензависимый путь для данной патологии реализуется посредством активации андрогеновых рецепторов (AR) [3, 4] дегидротестостероном, образующийся комплекс транслицируется в ядро и взаимодействует с ключевыми транскрипционными факторами и ДНК. При андрогеннезависимом РПЖ в развитии основного процесса в большей мере принимают участие ростовые и транскрипционные факторы [5].

В ацинарных структурах нормальной ткани предстательной железы определяется, как правило, высокое содержание AR и низкий уровень эстрогеновых рецепторов (ER). При развитии опухолевого процесса отмечается значимое увеличение экспрессии ER вместе с AR. Показано, что в процессах перехода простатической интраэпителиальной неоплазии в рак важную роль играют ER $\alpha$  и ER $\beta$  [6]. В настоящее время существует представление о наличии соотношения и взаимосвязей между AR и ER, что в значительной мере определяет развитие и прогрессирование РПЖ [7]. Считается, что ER $\alpha$  способны активировать пролиферацию опухолевых клеток при наличии мутации фосфатазы PTEN [8], стимулируя сигнальные пути АКТ/m-TOR, MAPK. ER $\beta$  чаще рассматривается в качестве онкосупрессора [9, 10]. Можно полагать, что эти молекулярные характеристики опухоли в значительной мере определяют не только ее биологическое поведение, но и ответ на терапию, а также исход заболевания [11].

В настоящее время рассматривается ряд биологических показателей, связанных с рецепторным статусом опухоли, на основании которых возможно было бы прогнозировать не только ожидаемый эффект АДТ, но и его продолжительность. Однако они практически не используются в клинической практике [6]. Имеются единичные данные о связи особенностей метаболизма тестостерона с риском прогрессии опухоли [12], которые не позволяют оценить продолжительность реализации эффекта терапии.

**Цель исследования** – изучение роли молекулярных маркеров в прогнозировании ожидаемой продолжительности эффекта от АДТ у пациентов с местно-распространенным и диссеминированным РПЖ.

### Материалы и методы

В исследование включены 48 больных местно-распространенным и метастатическим РПЖ, которые были разделены на 2 группы в зависимости от длительности проведения АДТ (бикалутамид 50 мг, бусерелин 3,6 мг). Эффект терапии, реализующийся в сроки до

12 мес от ее начала, был отмечен у 23 пациентов (1-я группа) и более 12 мес – у 25 больных (2-я группа). Стандартное обследование пациентов включало проведение биопсии для верификации диагноза, определение уровней простатического специфического антигена (ПСА) и тестостерона в сыворотке крови, остеосцинтиграфию. В дальнейшем всем пациентам, согласно рекомендациям, выполнялась терапия антиандрогенами (гозелерин 4 мг) и аналогами лютеинизирующего рилизинг-гормона, пациентам с метастатическим поражением костных структур дополнительно проводилась терапия бисфосфонатами. Лечение рассматривали как эффективное при достижении кастрационных значений тестостерона крови (до 0,2 нмоль/л) и снижении уровня ПСА.

Объемы диагностики и лечения больных соответствовали рекомендуемым алгоритмам, утвержденным Министерством здравоохранения и социального развития России. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании (протокол № 1 от 20.02.2017).

Материалом для исследования явились образцы опухолевой ткани, полученные при проведении диагностической биопсии. Нормальная ткань предстательной железы для изучения экспрессии молекулярных показателей (группа контроля) была получена при выполнении радикальной цистэктомии у пациентов, не имеющих опухолевых поражений предстательной железы и не включенных в исследование.

**Выделение мРНК образцов тканей.** Ткани помещали в раствор RNeasyLysis (Qiagen, США) и сохраняли при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  (после 24-часовой инкубации при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ ). РНК выделяли с помощью набора RNeasyMiniKit, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Германия). Для оценки количества выделенной РНК на спектрофотометре NanoDrop-2000 (ThermoScientific, США) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила 80–250 нг/мкл ( $A_{260}/A_{280} = 1,95\text{--}2,05$ ;  $A_{260}/A_{230} = 1,90\text{--}2,31$ ). Целостность РНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, США). RIN составил 5,6–7,8.

**Исследование экспрессии молекулярных показателей.** Уровень экспрессии генов оценивали с помощью количественной обратной-транскриптазной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RT-qPCR) с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США). Для получения комплементарной ДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора ОТm-MuLV-RH (БиоЛабмикс, Россия) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией производителя. Полимеразную цепную реакцию ставили в 3 репликах в объеме

25 мкл, содержащем 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (БиоЛабмикс, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала: 1 цикл – 94 °С, 10 мин, – предварительная денатурация; 40 циклов – 1-й шаг 94 °С, 10 с, и 2-й шаг 60 °С, 20 с. Праймеры были подобраны с использованием программы VectorNTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>) (табл. 1). В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии GAPDH. Количественный анализ экспрессии проводили по 2ΔΔCT по отношению к конститутивно-экспрессируемому референсному гену фермента GAPDH. Результаты выражали в условных единицах (усл. ед.).

**Таблица 1.** Последовательность праймеров проб исследованных генов  
**Table 1.** Primer sequences for the studied genes

Ген Gene	Ампликон Amplicon	Последовательность Sequence
AR NM_000044	190 п.н. 190 bs	F 5'-GAGGGACAGCAG GCAGA-3' R 5'-GCTATCAGAACA CACACACACT-3'
ESR1 NM_000125	386 п.н. 386 bs	F 5'-TCCTGATGATTG GTCTCGTCT-3' R 5'-GATGTGGGAGAG GATGAGGA-3'
GAPDH NM_001256799.2	138 п.н. 138 bs	F 5'-GGAAGTCAG GTGGAGCGA-3' R 5'-GCAACAATATCCA CTTTACCAGA-3'

**Примечание.** NM – номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>); п.н. – пары нуклеотидов; F – прямой праймер; R – обратный праймер.

**Note.** NM – the number of a RNA sequence in the NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>); bs – base pairs; F – forward primer; R – reverse primer.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ Statistica 8.0. Проверку предположения о нормальности распределения признаков выполняли с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Значимость различий оценивали по критерию Манна–Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представлены как Me (Q1; Q3). При построении статистической модели был использован дискриминантный анализ.

### Результаты

В результате проведенного исследования отмечено, что пациенты в группах различались по возрасту, уровню тестостерона и содержанию ПСА (табл. 2).

**Таблица 2.** Клинико-морфологические характеристики пациентов с раком предстательной железы в зависимости от продолжительности эффекта андрогендепривационной терапии

**Table 2.** Clinical and morphological characteristics of patients with prostate cancer depending on the duration of effect of androgen deprivation therapy

Показатель Characteristic	Эффект андрогендепривационной терапии до 1 года, Me (Q1; Q3) Effect of androgen deprivation therapy under 1 year, Me (Q1; Q3)	Эффект андрогендепривационной терапии более 1 года, Me (Q1; Q3) Effect of androgen deprivation therapy over 1 year, Me (Q1; Q3)
Возраст, лет Age, years	53,0 (41,0; 65,0)	67,5 (63,0; 72,0)*
Сумма баллов по шкале Глисона Gleason score	7,5 (6,0; 9,5)	7,0 (7,0; 8,0)
Уровень тестостерона, нмоль/л Testosterone level, nmol/l	5,7 (4,6; 6,8)	2,72 (0,71; 2,97)*
Уровень простатического специфического антигена, нг/мл Prostate-specific antigen level, ng/ml	34,9 (29,8; 40,0)	47,3 (44,3; 132,0)*

\*Значимость различий,  $p < 0,05$ .

\*Significance of difference,  $p < 0.05$ .

Так, больные с ответом на АДТ <12 мес и ранним рецидивированием были в 1,3 раза моложе, имели более высокий исходный уровень тестостерона (в 2 раза) и более низкий уровень ПСА (в 1,35 раза) по сравнению с пациентами, у которых наблюдался длительный ответ (>12 мес) на проводимую терапию.

При изучении молекулярных характеристик опухоли у пациентов с ранним прогрессированием заболевания выявлены исходно повышенная экспрессия AR (>64,0 усл. ед.) и сниженная экспрессия ERα (<3,6 усл. ед.) (табл. 3) по сравнению с больными, у которых продолжительность АДТ превышала 12 мес. В данной группе пациентов наблюдалось одновременное возрастание уровня мРНК и ERα, и AR.

Проведенный анализ позволил выявить наиболее значимые прогностические показатели в отношении времени реализации ожидаемого эффекта АДТ: возраст пациента, уровни тестостерона и ПСА, экспрессии AR и ERα в ткани опухоли (табл. 4). На основании полученных данных были рассчитаны дискриминантные функции Y1, Y2 по следующим уравнениям:

$$Y1 = -33,37 + 1,0X1 + 0,01X2 + 0,01X3 + 1,08X4 - 0,0004X5 \text{ (ранняя (в сроки <12 мес от начала проведения терапии) резистентность к АДТ);}$$

**Таблица 3.** Экспрессии андрогеновых рецепторов (AR), эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), эстрогеновых рецепторов  $\beta$  (ER $\beta$ ) у пациентов с раком предстательной железы в зависимости от продолжительности эффекта андрогендепривационной терапии

**Table 3.** Expression of androgen receptors (AR), estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), estrogen receptors  $\beta$  (ER $\beta$ ) in patients with prostate cancer depending on the duration of effect of androgen deprivation therapy

Показатель Characteristic	Эффект андрогендепривационной терапии до 1 года, Ме (Q1; Q3) Effect of androgen deprivation therapy under 1 year, Me (Q1; Q3)	Эффект андрогендепривационной терапии более 1 года, Ме (Q1; Q3) Effect of androgen deprivation therapy over 1 year, Me (Q1; Q3)
AR	128 (96,0; 122,0)	64,0 (32,0; 128,0)*
ER $\alpha$	1,5 (0,75; 5,0)	3,6 (2,0; 256,0)*
ER $\beta$	2,0 (0; 4,0)	0,1 (0,02; 4,0)

\*Значимость различий,  $p < 0,05$ .

\*Significance of difference,  $p < 0.05$ .

$$Y_2 = -59,27 + 1,75X_1 + 0,03X_2 + 0,23X_3 - 4,02X_4 + 0,007X_5 \text{ (отсроченная (в сроки } >12 \text{ мес от начала проведения терапии) резистентность к АДТ и прогрессирование РПЖ),}$$

где  $X_1$  – возраст пациента, лет;  $X_2$  – экспрессия AR в опухоли, усл. ед.;  $X_3$  – экспрессия ER $\alpha$  в опухоли, усл. ед.;  $X_4$  – содержание тестостерона в сыворотке крови, нмоль/л;  $X_5$  – содержание ПСА в сыворотке крови, нг/мл.

При  $Y_1 > Y_2$  следует ожидать раннего прогрессирования заболевания на фоне АДТ в сроки  $< 12$  мес от начала проведения терапии, а при  $Y_1 < Y_2$  – отсроченное – в сроки  $> 12$  мес от начала проведения терапии.

Чувствительность и специфичность полученной дискриминантной модели составила соответственно 99,5 и 91,7 %, диагностическая точность – 95,6 %.

### Обсуждение

Высокие уровни ПСА и тестостерона – стандартные признаки, определяющие показания для проведения АДТ у больных РПЖ [13, 14]. При этом в клинической практике бывает очень сложно предполагать продолжительность эффекта от проводимой терапии. В литературе, как правило, обсуждается прогностическая значимость отдельных клинических и молекулярных параметров. Так, в качестве неблагоприятного признака, ассоциированного с развитием ранней ре-

**Таблица 4.** Показатели, включенные в дискриминантную модель прогнозирования ожидаемой продолжительности эффективности андрогендепривационной терапии у больных раком предстательной железы

**Table 4.** Characteristics included in a discriminatory model of prognosis of expected duration of effectiveness of androgen deprivation therapy in patients with prostate cancer

Показатель Characteristic	Wilks Lambda	Toler.	$p$
Возраст пациента Patient age	0,315367	0,694706	0
Экспрессия андрогеновых рецепторов Androgen receptor expression	0,176739	0,751103	0,002160
Экспрессия эстрогеновых рецепторов $\alpha$ Estrogen receptor $\alpha$ expression	0,169194	0,822430	0,010485
Содержание тестостерона Testosterone level	0,501745	0,202200	0
Уровень простатического специфического антигена Prostate-specific antigen level	0,448715	0,187039	0

зистентности, рассматривается молодой возраст больных [15]. Также признаком прогрессирования заболевания является высокое содержание AR в опухоли в отличие от ER $\beta$ , высокий уровень которого, напротив, может свидетельствовать о благоприятном исходе опухолевого процесса [6, 7]. Поэтому оправданно использование комплексного подхода в оценке ожидаемой продолжительности эффекта АДТ, позволяющего учитывать наиболее значимые клинические, морфологические и молекулярные параметры и тем самым повысить точность прогноза.

### Заключение

Таким образом, определена совокупность информативных параметров, анализ которых позволяет прогнозировать продолжительность ожидаемого ответа на АДТ у больных РПЖ. Эти данные необходимо учитывать при планировании адекватной тактики лечения, сроков ее проведения и динамического наблюдения у больных местно-распространенным и метастатическим РПЖ.



## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Маркова А.С., Поликарпова С.Б., Камолов Б.Ш. и др. Факторы прогноза общей выживаемости больных метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы. *Онкоурология* 2015;11(2):77–84. DOI: 10.17650/1726-9776-2015-11-2-77-84. [Markova A.S., Polikarpova S.B., Kamolov B.S. et al. Predictors of overall survival in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2015;11(2):77–84. (In Russ.)].
2. Amiya Y., Yamada Y., Sugiura M. et al. Treatment of locally advanced prostate cancer (Stage T3). *Jpn J Clin Oncol* 2017;47(3):257–61. DOI: 10.1093/jjco/hyw186. PMID: 28096182.
3. Wang Y., Kreisberg J.I., Ghosh P.M. Cross-talk between the androgen receptor and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7(6):591–604. PMID: 17896924.
4. D'Amico A.V., Moul J., Carroll P.R. et al. Prostate specific antigen doubling time as a surrogate end point for prostate cancer specific mortality following radical prostatectomy or radiation therapy. *J Urol* 2004;172(5 Pt 2):42–6. PMID: 15535442.
5. Loneragan P.E., Tindall D.J. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog* 2011;10:20. DOI: 10.4103/1477-3163.83937. PMID: 21886458.
6. Al-Maghrabi J.A., Hassan T.M., Abdel-Meguid T.A., Mosli H.A. Original article expression of estrogen alpha and beta receptors in prostate cancer and hyperplasia: immunohistochemical analysis. *African J Urol* 2010;16(3):1110–5704.
7. Karamouzis M.V., Papavassiliou K.A., Adamopoulos C., Papavassiliou A.G. Targeting androgen/estrogen receptors crosstalk in cancer. *Trends Cancer* 2016;2(1):35–48. DOI: 10.1016/j.trecan.2015.12.001. PMID: 28741499.
8. Takizawa I., Lawrence M.G., Balanathan P. et al. Estrogen receptor alpha drives proliferation in PTEN-deficient prostate carcinoma by stimulating survival signaling, MYC expression and altering glucose sensitivity. *Oncotarget* 2015;6(2):604–16. DOI: 10.18632/oncotarget.2820. PMID: 25436982.
9. Ahmad N., Kumar R. Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics. *Cancer Lett* 2011;300(1):1–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.09.008. PMID: 20926181.
10. Nelson A.W., Tilley W.D., Neal D.E., Carroll J.S. Estrogen receptor beta in prostate cancer: friend or foe? *Endocr Relat Cancer* 2014;21(4):T219–34. DOI: 10.1530/ERC-13-0508. PMID: 24402043.
11. Спирина Л.В., Горбунов А.К., Кондакова И.В. и др. Экспрессия транскрипционного фактора TRIM16 в ткани рака предстательной железы, связь с экспрессией эстрогеновых и андрогеновых рецепторов и клинико-морфологическими особенностями заболевания. *Бюллетень сибирской медицины* 2018;17(3):122–30. DOI: org/10.20538/1682-0363-2018-3-122-130. [Spirina L.V., Gorbunov A.K., Kondakova I.V. et al. TRIM16 transcription factor in prostate cancer, association with the expression of estrogen and androgen receptors and clinical and morphological features of the disease. *Bulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine* 2018;17(3):122–30. (In Russ.)].
12. Hearn J.W.D., AbuAli G., Reichard C.A. et al. HSD3B1 and resistance to androgen-deprivation therapy in prostate cancer: a retrospective, multicohort study. *Lancet Oncol* 2016;17(10):1435–44. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30227-3. PMID: 27575027.
13. Geara F.B., Bulbul M., Khauli R.B. et al. Nadir PSA is a strong predictor of treatment outcome in intermediate and high risk localized prostate cancer patients treated by definitive external beam radiotherapy and androgen deprivation. *Radiat Oncol* 2017;12(1):149. DOI: 10.1186/s13014-017-0884-y. PMID: 28882187.
14. Michaud J.E., Billups K.L., Partin A.W. Testosterone and prostate cancer: an evidence-based review of pathogenesis and oncologic risk. *Ther Adv Urol* 2015;7(6):378–87. DOI: 10.1177/1756287215597633. PMID: 26622322.
15. Печерский А.В., Семиглазов В.Ф., Комьяков Б.К. и др. Изменение экспрессии рецепторов стероидных гормонов при развитии частичного возрастного андрогенного дефицита (PADAM). *Цитология* 2005;47(4):311–6. DOI: 10.17650/1726-9776-2015-11-2-77-84. [Pechersky A.V., Semiglazov V.F., Komyakov B.K. et al. Change in steroid receptors expression in partial androgen deficiency of the ageing male (PADAM). *Tsylogiya = Cytology* 2005;47(4):311–6. (In Russ.)].

**Вклад авторов**

Л.В. Спирина: написание обзора, анализ данных литературы;  
 А.К. Горбунов, И.В. Кондакова: редактирование обзора, обзор публикаций по теме статьи;  
 Е.А. Усын: формирование концепции и дизайна исследования;  
 Е.М. Слонимская: научное редактирование статьи, обзор публикаций по теме статьи.

**Authors' contributions**

L.V. Spirina: article writing, literature data analysis;  
 A.K. Gorbunov, I.V. Kondakova: article review, reviewing of publications of the article's theme;  
 E.A. Usynin: formation of the concept and design of the study;  
 E.M. Slonimskaya: scientific article editing, reviewing of publications of the article's theme.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Л.В. Спирина/L.V. Spirina: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>  
 И.В. Кондакова/I.V. Kondakova: <http://orcid.org/0000-0003-0907-4615>  
 Е.М. Слонимская/E.M. Slonimskaya: <http://orcid.org/0000-0003-4382-569>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН».

**Financing.** The study was performed with the support of Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

**Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Informed consent.** All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 18.01.2019. **Принята к публикации:** 28.02.2019.

**Article received:** 18.01.2019. **Accepted for publication:** 28.02.2019.

# Роль ABC-транспортеров в формировании лекарственной устойчивости к бортезомибу при множественной миеломе

Л.А. Лалетина, Н.И. Моисеева, Д.А. Климова, А.А. Ставровская

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Лидия Александровна Лалетина [ranlidia@gmail.com](mailto:ranlidia@gmail.com)

**Цель исследования** — изучение роли ABC-транспортеров и фактора транскрипции белка YB-1 в формировании лекарственной устойчивости к ингибитору протеасом бортезомибу при множественной миеломе.

**Материалы и методы.** В качестве моделей использовали культуры RPMI8226 и NCI-H929 и их резистентные к бортезомибу сублинии.

**Результаты.** Два основных белка ABC-транспортера — P-гликопротеин и MRP1 не участвуют в возникновении устойчивости к бортезомибу, более того, данный препарат способствует снижению их экспрессии. Экспрессия гена MVP повышалась только в устойчивом варианте RPMI8226/btz-6, но не в H929/btz-6. Также только в RPMI8226/btz-6 локализация белка YB-1, который является фактором транскрипции для генов MDRI, MRP1 и MVP, изменялась — становилась диффузной в 20 % клеток по сравнению с 7 % клеток в родительской линии RPMI8226. Единственный ABC-транспортер, экспрессия которого увеличивалась и в сублинии RPMI8226/btz-6, и в сублинии H929/btz-6, был ген BCRP. Также для этих же сублиний была показана перекрестная устойчивость к доксорубину.

**Заключение.** Таким образом, активация ABC-транспортеров не является ключевым механизмом формирования лекарственной устойчивости к бортезомибу. Некоторую роль может играть белок MVP, а повышение экспрессии BCRP объясняет возникновение устойчивости к доксорубину, но не к бортезомибу, так как последний не является субстратом BCRP.

**Ключевые слова:** бортезомиб, множественная миелома, множественная лекарственная устойчивость, ABC-транспортер, YB-1, P-гликопротеин, MRP1, BCRP, MVP

**Для цитирования:** Лалетина Л.А., Моисеева Н.И., Климова Д.А., Ставровская А.А. Роль ABC-транспортеров в формировании лекарственной устойчивости к бортезомибу при множественной миеломе. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(1):49–56.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-49-56

## The role of ABC transporters in drug resistance to bortezomib in multiple myeloma

L.A. Laletina, N.I. Moiseeva, D.A. Klimova, A.A. Stavrovskaya

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Background.** In our work, we investigated the role of ABC transporters and the transcription factor YB-1 protein in the formation of drug resistance to the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma.

**Materials and methods.** We used the RPMI8226 and NCI-H929 cultures and their bortezomib-resistant sublines as models.

**Results.** Two major ABC transporter proteins, P-glycoprotein and MRP1, are not involved in the emergence of resistance to bortezomib, moreover, bortezomib contributed to decrease of these genes expression. Expression of the MVP gene was increased only in the resistant RPMI8226/btz-6 variant, but not in H929/btz-6. The localization of the YB-1 protein, a transcription factor for the MDRI, MRP1 and MVP genes, changed only in RPMI8226/btz-6 cells, as well, it became diffuse in 20 % of the cells as compared to 7 % of the cells in the RPMI8226 parent line. The only ABC transporter gene, activated in both RPMI8226/btz-6 and H929/btz-6 sublines, was BCRP. Cross-resistance to doxorubicin is also shown for these sublines.

**Conclusion.** Thus, the activation of ABC transporters is not a key mechanism for the formation of bortezomib drug resistance. MVP protein may play certain role, and an increase in the BCRP expression explains the emergence of resistance to doxorubicin, but not to bortezomib, since the latter is not a substrate of BCRP.

**Key words:** bortezomib, multiple myeloma, multidrug resistance, ABC- transporter, YB-1, P-glycoprotein, MRP1, BCRP, MVP

**For citation:** Laletina L.A., Moiseeva N.I., Klimova D.A., Stavrovskaya A.A. The role of ABC transporters in drug resistance to bortezomib in multiple myeloma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):49–56.

### Введение

Множественная миелома (ММ) — злокачественное новообразование, происходящее из терминально дифференцированных В-лимфоцитов — плазматических клеток с иммунофенотипом CD38+/CD138+, продуцирующих моноклональный иммуноглобулин. ММ составляет приблизительно 1 % среди всех злокачественных опухолей и 13 % среди гемопоэтических опухолей [1].

Бортезомиб — ингибитор активности протеасом (PS-341, Velcade) — сейчас входит в 1-ю линию химиотерапии ММ [2]. Однако с течением времени к нему развивается лекарственная устойчивость, механизмы формирования которой пока мало изучены.

Один из основных видов лекарственной устойчивости — множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) — система защиты клеток одновременно от многих лекарств, различающихся по химической структуре и механизму действия на клетку [3]. Среди различных механизмов МЛУ опухолей наиболее охарактеризованным является повышенная активность белка семейства ABC (ATP binding cassette) Р-гликопротеина (Pgp), кодируемого геном *MDR1* (*ABCB1*). Белок Pgp, используя энергию аденозинтрифосфата, транспортирует группы различающихся по структуре веществ из цитозоля во внеклеточное пространство. В семейство ABC-транспортеров входит несколько других мембранных белков, имеющих отношение к МЛУ, таких как белки семейства MRP (семейство ABCС), белок BCRP (ABCG2) и др. [4].

Белок YB-1 является ДНК/РНК-связывающим белком с различными функциями [5]. Белок YB-1 чаще находится в цитоплазме клеток в комплексе с РНК, регулируя трансляцию, однако при фосфорилировании Akt-киназой может перемещаться в ядра клеток [6]. В ядре YB-1 функционирует как фактор транскрипции, регулируя экспрессию генов, содержащих в промоторе Y-бокс, в том числе генов МЛУ *MDR1* и *MRP1* [7] и гена *MVP* (LRP) [8].

Влияние бортезомиба на экспрессию генов и белков, вовлеченных в МЛУ, недостаточно изучено [9]. В одной из наших работ мы показали, что клетки линии хронического миелолейкоза K562 не приобретают устойчивости к бортезомибу, несмотря на активацию Pgp, тогда как линия K562/i-S9 с трансфецированным геном *MDR1* приобретает устойчивость к бортезомибу, и в ней экспрессия Pgp увеличивается как на уровне матричной РНК (мРНК), так и на уровне белка [10]. Таким образом, роль ABC-транспортеров в формировании лекарственной устойчивости все еще остается областью активных исследований.

**Цель исследования** — оценка участия ABC-транспортеров в возникновении устойчивости к бортезомибу в клеточных линиях ММ.

### Материалы и методы

**Клеточные культуры.** В работе использовали клетки линий ММ RPMI8226 и NCI-H929. Линия

NCI-H929 была получена из коллекции клеточных культур ATCC, линия RPMI8226 — из российской коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Устойчивые к бортезомибу сублинии RPMI8226/btz-6 и H929/btz-6 выведены путем длительного культивирования (около полугода) в среде с добавлением бортезомиба (Selleckchem, США). Клетки культивировали в среде RPMI1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (РАА, Австрия) и 50 мкг/мл гентамицина (Россия). Все линии клеток культивировали при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>.

**МТТ-тест.** Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты по 20–25 × 10<sup>3</sup> клеток в лунку. Препараты (бортезомиб, доксорубин (Sigma-Aldrich, США) в объеме 15 мкл добавляли в различных концентрациях в тот же день. В контрольные лунки добавляли 15 мкл бессысывороточной среды. Клетки культивировали в присутствии химиопрепаратов в течение 48 ч. Затем в лунки добавляли реагент МТТ в концентрации 5 мг/мл в объеме 20 мкл на лунку. Через 3 ч среду с реагентом удаляли и осадок растворяли в 60 мкл ДМСО. Уровень оптической плотности определяли с помощью спектрофотометра MultiScan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 492 нм.

**Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ).** Тотальную РНК выделяли из клеток реагентом ExtractRNA (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Качество РНК проверяли с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, содержащем 0,01 % бромистого этидия. Применяли ПЦР-РВ: для синтеза комплементарной ДНК использовали реакционную смесь ОТ-РТ (Синтол, Россия). При постановке ПЦР-РВ применяли набор для проведения ПЦР-РВ и интеркалирующий флуоресцентный агент Eva Green (Синтол, Россия). Обе реакционные смеси готовили по протоколу производителя. Реакция ставилась в амплификаторе компании Bio-Rad (США). Шаги амплификации: 95°С — 5:00 мин, 72°С — 00:10 мин, 60°С — 00:30 мин, 72°С — 00:30 мин. Нормализацию результатов проводили по housekeeping гену *RPL27*. Использовали следующие пары праймеров: YB-1 forward CCCCAGGAAGTACCTTCGC, reverse AGCGTCTATAATGGTTACGGTCT; MDR1 forward GGGATGGTCAGTGTGATGGA, reverse GCTATCGTGGTG-GCAAACAATA; MRP1 forward GTGAATCGTGCC-ATCGACATA, reverse GCTTGGGACGGAAGGGAATC; MVP forward TACATCCGGCA-GGACAATGAG, reverse CTGTGCAGTAGTGACGTGGG; BCRP forward TGAGCCTACAAGTGGCTTAGA, reverse CCCTGCTTAGACAT-CCTTTTCAG; RPL27 forward ACCGCTACCCCGCAAAGTG; reverse CCCGTCCGGCCTTGCGTTTA. Проводили 3 независимых эксперимента. Оценку результатов ПЦР-РВ осуществляли методом ΔΔCt (разница циклов амплификации исследуемого гена и контрольного гена).

**Иммуноцитохимическая окраска клеток и проточная цитофлуориметрия.** Для определения внутриклеточной локализации белка YB-1 клетки растили в 12-луночном плато, фиксировали 4 % раствором параформальдегида и нарушали целостность клеточной мембраны 0,1 % Triton X-100. Затем их инкубировали с кроличьими поликлональными антителами к YB-1 (Институт белка РАН, Россия) в течение 1,5 ч. После инкубации с антителами клетки трижды промывали PBS. Далее клетки 1 ч инкубировали со вторыми антителами к иммуноглобулину класса G кролика, меченными AlexaFluor488 (Invitrogen, США), в которые также добавляли агент Hoechst 33258 в разведении 1:1000. Агент Hoechst 33258 способен связываться с ДНК, таким образом позволяя определить локализацию ядра в клетке.

Экспрессию белка Pgp (BD Pharmingen, США) в клетках RPMI8226 и RPMI8226/btz-6, NCI-H929 и H929/btz-6 оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACS CantoII. Получали суспензию исследуемых клеток и инкубировали ее в течение 40 мин с напрямую мечеными FITC антителами, в темноте при комнатной температуре. Отмывали в PBS дважды.

**Вестерн-блоттинг.** Клетки (2 млн) суспендировали в 150 мкл лизирующего буфера RIPA buffer x1 (Thermo Scientific, США) в течение 20–30 мин при температуре +4 °С. Далее лизат центрифугировали на 13 400 об/мин в течение 30 мин и отбирали чистый супернатант (лизат), затем добавляли x1 Sample buffer (1 М Трис-НСl, рН 6,8, 10 % додецилсульфата натрия (SDS), 50 % глицерина, 10 % меркаптоэтанола и бромфенолового синего), помещали в водяную баню при температуре 96 °С на 10 мин. Белки разделяли в 10 % полиакриламидном геле в присутствии 10 % SDS и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Amersham, США), после инкубировали в 5 % БСА (бычий сывороточный альбумин) в 1x TBST (Трис-буфер рН 7,5 с 0,005 % твином) в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном покачивании. Затем мембраны промывали в TBST и инкубировали со специфическими моноклональными мышинными антителами против YB-1 (Институт белка РАН, Россия) и с антителами против актина, мечеными пероксидазой, в разведении 1:500 в течение ночи при температуре 4 °С. Далее мембраны отмывали в TBST 3 раза по 10 мин и инкубиро-

вали со вторыми мышинными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Jackson ImmunoResearch, США), в разведении 1:1000. После этого мембрану отмывали 3 раза в TBST и проявляли с помощью ECL-реагента (Thermo Fisher, США). Съемку проводили на приборе для люминесцентного анализа ImageQuant Las 4000 (США).

**Статистический анализ.** Опыты ставили в 2–3 повторях, данные представлены как  $M \pm SD$ . Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Статистически значимой разницей считалась при  $p < 0,05$ .

### Результаты

**Оценка лекарственной устойчивости исследуемых линий ММ.** В ходе длительной культивации (20 нед) клеточных культур RPMI8226 и NCI-H929 с повышающимися концентрациями бортезомиба были получены устойчивые к нему сублинии RPMI8226/btz-6 и H929/btz-6. На 1-м этапе оценивали уровень полученной устойчивости к бортезомибу и наличие перекрестной резистентности к доксорубину (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что для сублинии RPMI8226/btz-6 была достигнута двукратная устойчивость к бортезомибу ( $p = 0,028$ ). В то же время в RPMI8226/btz-6 снижалась чувствительность к доксорубину в 3 раза ( $p = 0,022$ ), а в H929/btz-6 наблюдалась тенденция к снижению чувствительности к этим препаратам ( $p = 0,1$ ).

**Уровень экспрессии генов MЛУ и гена YB-1 в чувствительных и устойчивых клеточных линиях.** На следующем этапе мы оценили изменение экспрессии мРНК генов ABC-транспортёров и гена YB-1 (рис. 1, 2).

Экспрессия мРНК генов *MDR1* и *MRP1* снижалась в обеих резистентных сублиниях примерно в 2,0–2,5 раза. Так, для сублинии RPMI8226/btz-6 мы наблюдали снижение экспрессии гена *MDR1* в 2,4 раза ( $p = 0,001$ ), а гена *MRP1* – в 1,7 раза ( $p = 0,0022$ ), для сублинии H929/btz-6 наблюдалась лишь тенденция к снижению экспрессии этих генов в 2 раза (*MDR1*  $p = 0,14$ ; *MRP1*  $p = 0,1$ ) Только экспрессия гена *BCRP* увеличивалась в обеих устойчивых сублиниях: в RPMI8226/btz-6 – в 2,8 раза ( $p = 0,0006$ ), в H929/btz-6 – в 2,3 раза ( $p = 0,008$ ).

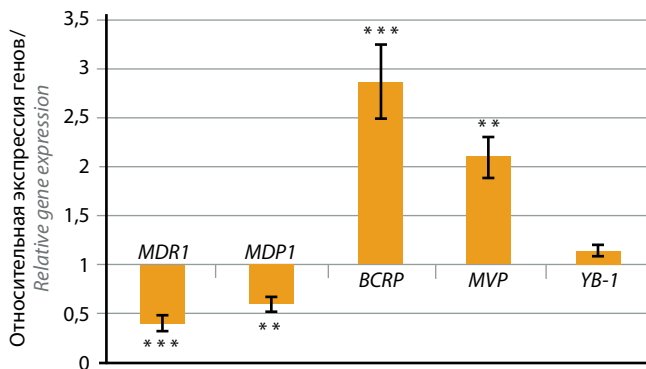
Белок LRP/MVP не является ABC-транспортёром. Это мажорный белок крупных рибонуклеопротеиновых частиц, он вовлечен в транспорт рецепторов

**Таблица 1.** Оценка степени чувствительности клеточных культур к бортезомибу и доксорубину (значения  $IC_{50}$ , нМ)

**Table 1.** Evaluation of cell line sensitivity to bortezomib and doxorubicin ( $IC_{50}$  values, nM)

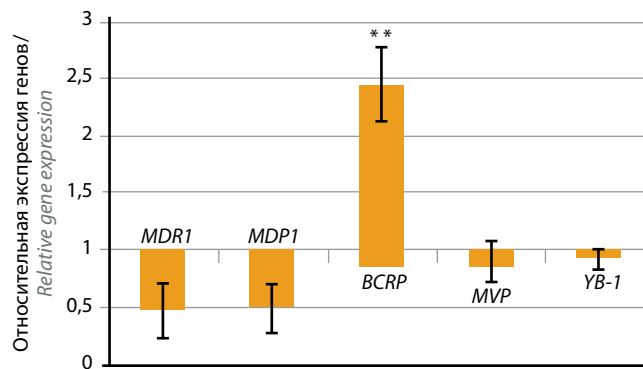
Препарат Drug	RPMI8226	RPMI8226/ btz-6	Индекс устойчивости Resistance index	NCI-H929	H929/ btz-6	Индекс устойчивости Resistance index
Бортезомиб Bortezomib	6,7 ± 2,6	16,0 ± 2,17	2,3	6,5 ± 0,8	12,7 ± 1,9	2,0
Доксорубин Doxorubicin	73,0 ± 5,7	285,0 ± 9,2	3,0	23,0 ± 1,0	35,0 ± 2,0	1,5





**Рис. 1.** Экспрессия матричной РНК различных генов в устойчивой сублинии RPMI8226/btz-6 относительно родительской линии RPMI8226. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

**Fig. 1.** Expression of messenger RNA of various genes in the resistant subline RPMI8226/btz-6 relative to the parental RPMI8226 line. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$



**Рис. 2.** Экспрессия матричной РНК различных генов в устойчивой сублинии H929/btz-6 относительно родительской линии NCI-H929. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

**Fig. 2.** Expression of messenger RNA of various genes in the resistant subline H929/btz-6 relative to the parental NCI-H929 line. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

**Таблица 2.** Экспрессия белка Pgp на поверхности клеток родительских линий и устойчивых к бортезомибу сублиний (проточная цитофлуоретрия), %  
**Table 2.** Pgp protein expression on the surface of the cells of the parental lines and sublines resistant to bortezomib (flow cytometry), %

Белок Protein	RPMI8226	RPMI8226/btz-6	NCI-H929	NCI-H929/btz-6	RPMI8226 + доксорубин 72 ч RPMI8226 + doxorubicin 72 hour	K562/i-S9*
Pgp (MDR1)	0	0	0	0	0	90

\*Положительный контроль (клетки линии хронического миелолейкоза, гиперэкспрессирующие белок Pgp).

\*Positive control (cell line of chronic myeloid leukemia hyperexpressing Pgp protein).

стероидных гормонов внутри клетки [11]. Поскольку известно, что этот белок может участвовать в детерминации МЛУ, мы охарактеризовали выбранные нами клеточные линии по количеству мРНК MVP. Экспрессия гена MVP не менялась в сублинии H929/btz-6 и возросла в 2,1 раза ( $p = 0,009$ ) в сублинии RPMI8226/btz-6 по сравнению с родительской культурой.

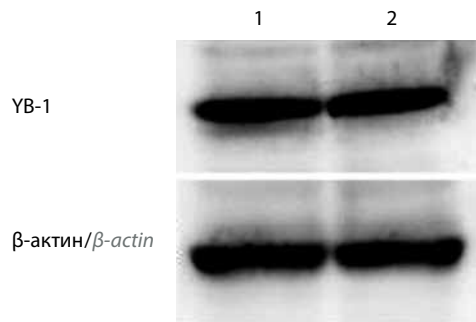
Экспрессия гена YB-1 не менялась в устойчивых сублиниях по сравнению с родительскими линиями. Таким образом, во всех исследованных нами устойчивых к бортезомибу сублиниях возрастает экспрессия мРНК гена BCRP.

**Оценка уровня экспрессии Р-гликопротеина в устойчивых сублиниях.** Ген MDR1 экспрессировался во всех исследованных нами линиях, поэтому следующей нашей задачей стала оценка продукта этого гена – белка Pgp.

Мы показали полное отсутствие экспрессии белка Pgp на поверхности клеток как в родительских, так и в устойчивых сублиниях при длительном и краткосрочном воздействии бортезомиба. Известно, что доксорубин является не только субстратом, но и активатором экспрессии белка Pgp. Однако краткосрочная (72 ч) инкубация с доксорубином также не привела к активации трансляции Pgp. В табл. 2 представлены результаты оценки количества белка Pgp на клетках родительских и устойчивых линий RPMI8226/btz-6 и H929/btz-6 с помощью проточной цитофлуоретрии.

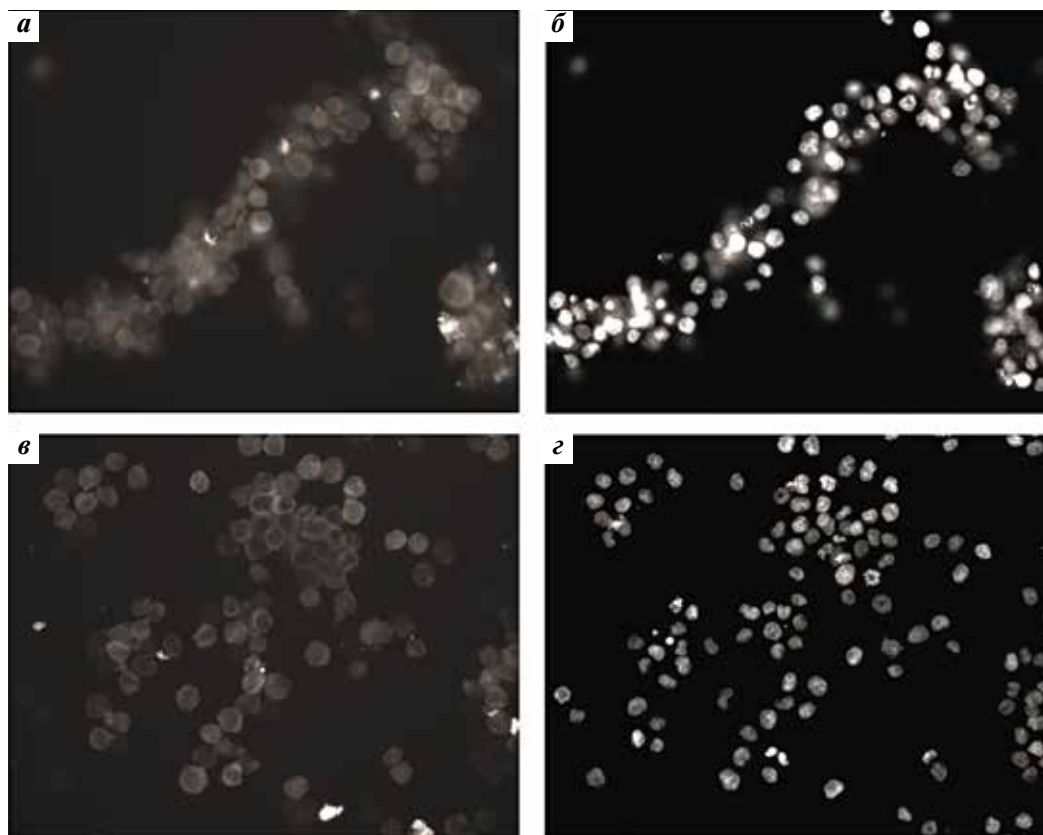
Таким образом, формирование устойчивости к бортезомибу не связано с активацией белка Pgp.

**Оценка количества и локализации белка YB-1 в парах родительских и устойчивых к бортезомибу клеток ММ.** В следующей части работы мы исследовали воздействие бортезомиба на количество белка YB-1 при длительной инкубации с этим веществом в клетках линии RPMI8226 и сублинии RPMI8226/btz-6. Мы показали, что экспрессия белка YB-1 не меняется в устойчивых к бортезомибу клетках сублинии RPMI8226/btz-6 и остается такой же высокой, как и в клетках линии RPMI8226 (рис. 3).



**Рис. 3.** Количество белка YB-1 в родительской и устойчивой линии: 1 – RPMI8226 и 2 – RPMI8226/btz-6

**Fig. 3.** YB-1 protein amount in the parental and resistant lines: 1 – RPMI8226 and 2 – RPMI8226/btz-6



**Рис. 4.** Локализация белка YB-1 в опухолевых клетках RPMI8226 и RPMI8226/btz-6: а – клетки RPMI8226, белок YB-1; б – ядра клеток RPMI8226, окрашенные Hoechst; в – клетки RPMI8226/btz-6, белок YB-1; г – ядра клеток RPMI8226/btz-6, окрашенные Hoechst  
**Fig. 4.** YB-1 protein localization in RPMI8226 and RPMI8226/btz-6 cell lines: а – RPMI8226 cells, YB-1 protein; б – RPMI8226 cell nuclei stained with Hoechst; в – RPMI8226/btz-6 cells, YB-1 protein; г – RPMI8226/btz-6 cell nuclei stained with Hoechst

Поскольку YB-1, перемещаясь в ядро, в качестве транскрипционного фактора может активировать гены МЛУ, мы сравнили его локализацию на парах родительских и устойчивых линий клеток RPMI8226 и RPMI8226/btz-6, NCI-H929 и H929/btz-6.

В исследуемых линиях мы не обнаружили явной ядерной локализации белка YB-1, т.е. случая, когда белок обнаруживается только в ядре и его практически нет в цитоплазме клеток. В родительской линии RPMI8226 белок YB-1 локализован в цитоплазме в 93 % клеток, однако в 7 % клеток мы наблюдали его диффузную локализацию, т.е. когда YB-1 равномерно распределен между цитоплазмой и ядром клетки. Однако в сублинии RPMI8226/btz-6 количество клеток с диффузной локализацией увеличивается в 3 раза – до 20 %. В клетках линии NCI-H929 и ее сублинии H929/btz-6 мы не наблюдали различий в локализации белка YB-1, а именно в 95 % клеток обеих культур этот белок определялся только в цитоплазме (рис. 4, 5).

### Обсуждение

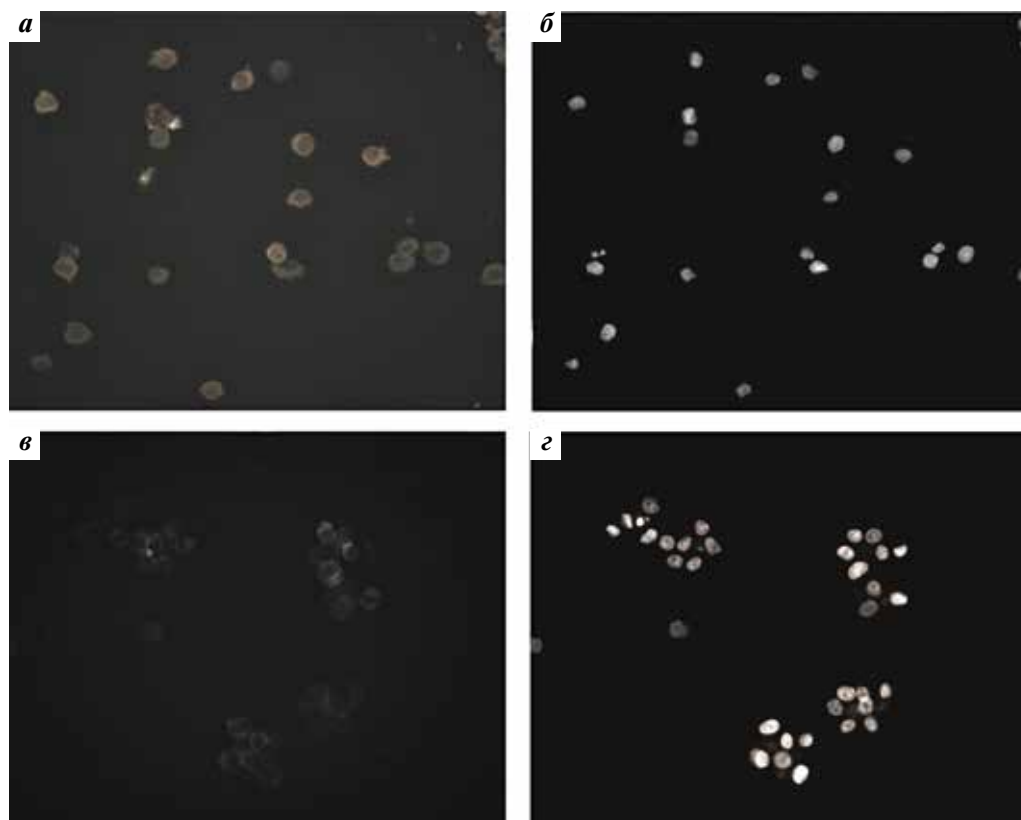
Настоящая работа посвящена вопросу о механизмах формирования устойчивости к бортезомибу при ММ. Наша исходная гипотеза заключалась в том, что устойчивость к бортезомибу может возникать за счет активации белков МЛУ.

Несмотря на невысокие уровни устойчивости изученных клеток, проведенная работа позволяет сделать несколько важных заключений.

Во-первых, данные показывают, что в устойчивой к бортезомибу сублинии RPMI8226/btz-6 снижается экспрессия мРНК генов *MDR1* и *MRP1* и не активируется синтез Pgp. Существуют работы на клетках сублинии хронического миелолейкоза и низкодифференцированной липосаркомы с гиперэкспрессией Pgp, где показано, что бортезомиб при краткосрочном воздействии приводит к снижению экспрессии *MDR1* эффективнее, чем в клетках, где он экспрессируется на относительно среднем уровне [12, 13]. Наши данные показывают, что и при долгосрочном воздействии бортезомиба этот эффект снижения экспрессии *MDR1* сохраняется.

Во-вторых, нами показано, что экспрессия другого гена, ответственного за МЛУ (*MVP*), в клетках сублинии RPMI8226/btz-6 повышалась в 2 раза по сравнению с клетками исходной линии RPMI8226. В то же время в клетках сублинии H929/btz-6 уровень экспрессии этого гена не изменялся. Мы полагаем, что возрастание экспрессии *MVP* в клетках сублинии RPMI8226/btz-6 связано с формированием устойчивости к бортезомибу.

В литературе существуют противоречивые данные о роли белка MVP в прогнозе лечения и выживаемости



**Рис. 5.** Локализация белка YB-1 в опухолевых клетках NCI-H929 и NCI-H929/btz-6: а – клетки NCI-H929, белок YB-1; б – ядра клеток NCI-H929, окрашенные Hoechst; в – клетки NCI-H929/btz-6, белок YB-1; г – ядра клеток NCI-H929/btz-6, окрашенные Hoechst  
**Fig. 5.** YB-1 protein localization in NCI-H929 and NCI-H929/btz-6 tumor cells: а – NCI-H929 cells, YB-1 protein; б – NCI-H929 cell nuclei stained with Hoechst; в – NCI-H929/btz-6 cells, YB-1 protein; г – NCI-H929/btz-6 cell nuclei stained with Hoechst

у пациентов с ММ. Так, в одной из работ показано, что высокая экспрессия гена *MVP* обнаружена в 73 % образцов ММ и ассоциирована с меньшей общей выживаемостью у первичных больных ММ, получавших полихимиотерапию с бортезомибом [14]. В другом исследовании продемонстрировано, что экспрессия белка *MVP* обнаруживалась значительно реже – в 12,5 % из 72 образцов ММ, и была одинаковой у больных с предшествующей терапией и без нее [15]. Также есть работа, в которой авторы показали, что *MVP* является предиктором плохого ответа на химиотерапию и прогноз у пациентов с раком яичников [16], тогда как в другой работе не было найдено никакой взаимосвязи между экспрессией *MVP* и клиническими данными [17].

Белок YB-1 является фактором транскрипции для генов *MDR1*, *MRP1* и *MVP* в некоторых культурах. Однако в линии RPMI8226/btz-6, где наблюдается перемещение небольшой части белка YB-1 в ядра клеток, увеличивается только экспрессия гена *MVP*. Мы полагаем, что для данной культуры активация генов *MDR1* и *MRP1* идет или не через YB-1, или дополнительно подавляется бортезомибом через путь NF- $\kappa$ B [12]. Однако активация экспрессии *MVP* все-таки может быть связана с транслокацией белка YB-1 в ядра клеток. Есть исследование, в котором продемонстрирована тесная корреляция ядерной экспрессии YB-1

с экспрессией *MVP* при раке яичника и раке толстой кишки, а также показано, что экспрессия *MVP* в первичной опухоли яичника является неблагоприятным прогностическим фактором в отношении выживаемости больных без лечения [18].

В-третьих, в нашей работе показано, что экспрессия гена *BCRP* увеличивалась в обеих резистентных сублиниях, также в этих сублиниях наблюдали повышение устойчивости к доксорубину. Мы полагаем, что устойчивость к доксорубину, по-видимому, связана с повышением экспрессии этого белка. Это важно, так как в схемах лечения больных ММ часто применяется доксорубин [2]. Однако существует работа, в которой авторы не наблюдали увеличения устойчивости к доксорубину на сходных клеточных моделях [19]. Авторы данной статьи вели устойчивые к бортезомибу сублинии в условиях, отличных от наших, а именно культивировали клетки в среде с повышенным содержанием сыворотки (15 %), возможно, этим объясняется различие в чувствительности к доксорубину нашей и их сублиний.

В литературе рассматривается несколько механизмов возникновения устойчивости к бортезомибу. Так, обнаружены мутации в  $\beta$ 5-субъединице протеасомы, с которой связывают повышенную устойчивость к бортезомибу, однако в клинической практике данные мутации встречаются редко [20]. Также длительное

действие бортезомиба приводит к повышению экспрессии  $\beta 5$ -субъединицы в резистентных сублиниях, а также к снижению экспрессии каспазы 3, т.е. к ингибированию апоптоза [19]. Кроме этого, сейчас в исследованиях большое внимание уделено отбору определенных популяций под действием бортезомиба, например side population [21] и популяций с измененным иммунофенотипом [22].

### Заключение

Таким образом, активация ABC-транспортеров не является ключевым механизмом формирования лекарственной устойчивости к бортезомибу. Некоторую роль может играть белок MVP, а повышение экспрессии BCRP объясняет возникновение устойчивости к доксорубину, но не к бортезомибу, так как последний не является субстратом BCRP.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бессмельцев С.С. Множественная миелома (патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз). Клиническая онкогематология 2013;6(3):237–57. [Bessmaltsev S.S. Multiple myeloma(pathogenesis, clinic, diagnosis, differential diagnosis). Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2013;6(3):237–57. (In Russ.)].
2. Moreau P., San Miguel J., Sonneveld P. et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2017;28(suppl 4):iv52–61. DOI: 10.1093/annonc/mdx096. PMID: 28453614.
3. Ставровская А.А., Генс Г.П. Некоторые новые аспекты исследований множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Успехи молекулярной онкологии 2014;(1):5–11. [Stavrovskaya A.A., Gens G.P. Some new aspects of the study of multidrug resistance of tumor cells. Espekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;(1):5–11. (In Russ.)].
4. Robey R., Pluchino K., Hall M. et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. Nat Rev Cancer 2018;18(7):452–64. DOI: 10.1038/s41568-018-0005-8. PMID: 29643473.
5. Елисеева И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г. и др. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. Успехи биологической химии 2011;51:65–132. [Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G. et al. Boxing BINDING PROTEIN 1 (YB-1) and its functions. Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry 2011;51:65–132. (In Russ.)].
6. Lasham A., Print C.G., Woolley A.G. et al. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target. Biochem J 2013;449(1):11–23. DOI: 10.1042/bj20121323. PMID: 23216250.
7. Stein U., Jurchott K., Walthers W. et al. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. J Biol Chem 2001;276(30):28562–9. DOI: 10.1074/jbc.m100311200. PMID: 11369762.
8. Stein U., Bergmann S., Scheffer G.L. et al. YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene. Oncogene 2005;24(22):3606–18. DOI: 10.1038/sj.onc.1208386. PMID: 15750632.
9. Wiberg K., Carlson K., Aleskog A. et al. *In vitro* activity of bortezomib in cultures of patient tumour cells-potential utility in haematological malignancies. Med Oncol 2009;26(2):193–201. DOI: 10.1007/s12032-008-9107-6. PMID: 19016012.
10. Панищева Л.А., Каклакова Е.С., Рыбалкина Е.Ю., Ставровская А.А. Влияние протеасомного ингибитора бортезомиба на экспрессию генов множественной лекарственной устойчивости и активность киназы. Биохимия 2011;76(9):1238–47. [Panishcheva L.A., Kakrakova E.S., Rybalkina E.Yu., Stavrovskaya A.A. Effect of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression of multidrug resistance and kinase activity. Biokhimiya = Biochemistry 2011;76(9):1238–47. (In Russ.)].
11. Scheffer G.L., Schroeijers A.B., Izquierdo M.A. et al. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. Curr Opin Oncol 2000;12(6):550–6. DOI: 10.1097/00001622-200011000-00007. PMID: 11085454.
12. Wang H., Wang X., Li Y. et al. The proteasome inhibitor bortezomib reverses P-glycoprotein-mediated leukemia multidrug resistance through the NF-kappaB pathway. Pharmazie 2012;67(2):187–92. PMID: 22512091.
13. Hu Y., Wang L., Wang L. et al. Preferential cytotoxicity of bortezomib toward highly malignant human liposarcoma cells via suppression of MDR1 expression and function. Toxicol Appl Pharmacol 2015;283(1):1–8. DOI: 10.1016/j.taap.2014.12.015. PMID: 25576094.
14. Черных Ю.Б., Голенков А.К., Шушанов С.С. Влияние экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости на клиническое течение множественной миеломы. Альманах клинической медицины 2016;44(5):624–30. [Chernykh Yu.B., Golenkov A.K., Shushanov S.S. The effect of gene expression of multidrug resistance on the clinical course of multiple myeloma. Al'manakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine 2016;44(5):624–30. (In Russ.)].
15. Schwarzenbach H. Expression of MDR1/P-glycoprotein, the multidrug resistance protein MRP, and the lung-resistance protein LRP in multiple myeloma. Medical Oncology 2002;19(2):87–104. DOI: 10.1385/mo:19:2:87. PMID: 11085454.
16. Izquierdo M.A., van der Zee A.G., Vermorken J.B. et al. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. J Natl Cancer Inst 1995;87(16):1230–7. DOI: 10.1093/jnci/87.16.1230. PMID: 7563169.
17. Arts H.J., Katsaros D., de Vries E.G. et al. Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. Clin Cancer Res 1999;5(10):2798–805. PMID: 10537344.
18. Oda Y., Ohishi Y., Basaki Y. et al. Prognostic implications of the nuclear localization of Y-box-binding protein-1 and CXCR4 expression in ovarian cancer: their correlation with activated Akt, LRP/MVP and P-glycoprotein expression. Cancer Sci 2007;98(7):1020–6. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00492.x. PMID: 17459055.
19. Balsas P., Galán-Malo P., Marzo I. et al. Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSM $\beta 5$  overexpression and polyploidy. Leuk Res 2012;36(2):212–8. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.09.011. PMID: 21978467.
20. Franke N.E., Kaspers G.L., Berg N. et al. Acquired resistance to bortezomib in human RPMI8226 multiple myeloma cells: molecular characterization, cross-



resistance with other proteasome inhibitors but marked sensitization to glucocorticoids. *Blood* 2008;112:2640.

21. Kim K.H., Cheong H.J., Lee M.Y. et al. Bortezomib is more effective to side population of RPMI8226 myeloma cells

than classical anti-myeloma agents. *Anticancer Res* 2019;39(1):127–33. DOI: 10.21873/anticancerres.13088. PMID: 30591449.

22. Park J., Bae E.K. Lee C. et al. Establishment and characterization

of bortezomib-resistant U266 cell line: constitutive activation of NF- $\kappa$ B-mediated cell signals and/or alterations of ubiquitylation-related genes reduce bortezomib-induced apoptosis. *BMB Rep* 2014;47(5):274–9. PMID: 24286313.

**Благодарность.** Коллектив авторов выражает большую признательность к.б.н. Е.Ю. Рыбалкиной и к.б.н. Н.Н. Калитину за ценные советы при подготовке статьи.

**Acknowledgment.** Authors express special thanks to E. Yu. Rybalkina, Ph. D. and N. N. Kalitin, Ph. D. for valuable advice during the preparation of the article.

#### Вклад авторов

Л.А. Лалетина: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Н.И. Моисеева: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Д.А. Климова: получение данных для анализа;

А.А. Ставровская: обзор публикаций по теме статьи.

#### Authors' contributions

L.A. Laletina: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;

N.I. Moiseeva: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;

D.A. Klimova: obtaining data for analysis;

A.A. Stavrovskaya: reviewing of publications of the article's theme.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Л.А. Лалетина/L.A. Laletina: <https://orcid.org/0000-0002-8839-5881>

Н.И. Моисеева/N.I. Moiseeva: <https://orcid.org/0000-0001-6697-7154>

Д.А. Климова/D.A. Klimova: <https://orcid.org/0000-0001-6241-1866>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант мол\_а № 18-315-00075).  
**Financing.** The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (grant мол\_а No. 18-315-00075).

**Статья поступила:** 20.02.2019. **Принята к публикации:** 11.03.2019.

**Article received:** 20.02.2019. **Accepted for publication:** 11.03.2019.

## Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки

Д.С. Кутилин, И.С. Никитин, О.И. Кит

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

**Контакты:** Денис Сергеевич Кутилин k.denees@yandex.ru

**Введение.** Во всем мире рак тела матки ежегодно диагностируют более чем у 300 тыс. женщин. В настоящее время остается актуальной проблема поиска высокоспецифичных молекулярных онкомаркеров для данного заболевания. Скрининг экспрессии генов транскрипционных факторов, ответственных за контроль дифференцировки клеток тканей эндометрия, может позволить сформировать панель онкомаркеров и исследовать фундаментальные механизмы онкотрансформации.

**Цель исследования** – анализ изменений в экспрессии транскрипционных факторов OCT4, SOX2 и C-MYC в тканях тела матки в процессе их малигнизации.

**Материалы и методы.** Для исследования использовали биоптаты тканей матки (опухолевые и условно-нормальные) 45 пациенток. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени проводили определение относительной экспрессии 3 генетических локусов, кодирующих транскрипционные факторы OCT4, SOX2 и C-MYC, в качестве референсного гена использовали ACTB.

**Результаты.** Обнаружено изменение транскрипционной активности генов OCT4, SOX2 и C-MYC в опухолевых клетках тела матки при прогрессии опухоли. При снижении степени дифференцировки опухолевых клеток наиболее значительно свою экспрессию увеличивает ген OCT4, что подтверждает его статус маркера недифференцированных клеток. По мере снижения степени дифференцировки опухолевых клеток изменение экспрессии генов OCT4, SOX2 и C-MYC затрагивает и прилегающую условно нормальную ткань тела матки, но с меньшей интенсивностью, особенно на поздних этапах малигнизации.

**Заключение.** Полученные данные делают возможным использование генов OCT4, SOX2 и C-MYC в качестве дифференциальных маркеров трансформации клеток, а изменение экспрессии гена SOX2 – и в качестве предиктивного маркера малигнизации.

**Ключевые слова:** экспрессия генов, транскрипционный фактор, плюрипотентность, рак тела матки

**Для цитирования:** Кутилин Д.С., Никитин И.С., Кит О.И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(1):57–62.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62

### Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri

D.S. Kutilin, I.S. Nikitin, O.I. Kit

Rostov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14<sup>th</sup> Line, Rostov-on-Don 344037, Russia

**Background.** Worldwide, more than 300,000 women are diagnosed with uterine cancer each year. Currently, the problem of finding highly specific molecular tumor markers for this disease remains relevant. Screening for gene expression of transcription factors responsible for controlling the differentiation of cells of endometrial tissues may allow the formation of a tumor markers panel and explore the fundamental mechanisms of oncotransformation.

**Objective** of our study was to analyze changes in the expression of transcription factors OCT4, SOX2 and C-MYC in the tissues of the uterus (corpus uteri) during the process of their malignancy.

**Materials and methods.** Uterus tissue biopsy specimens of 45 patients (tumor and non-tumor) were used for the study. To determine the relative expression of 3 genetic loci encoding the transcription factors OCT4, SOX2 and C-MYC the real-time polymerase chain reaction method, ACTB was used as the reference gene.

**Results.** A change of OCT4, SOX2 and C-MYC genes transcriptional activity in uterus tumor cells is found as the tumor develops. By reducing the tumor cells differentiation degree expression of OCT4 gene increases most significantly, that confirms its status of undifferentiated cellsmarker. As the differentiation degree of tumor cells decreases, OCT4, SOX2 and C-MYC genes expression change affects the adjacent conditionally normal tissue of the uterus, but with less intensity, especially in the later stages of malignancy.

**Conclusion.** The obtained data makes it possible to use the OCT4, SOX2 and C-MYC genes as differential markers of the tumor process development, and the SOX2 gene expression as a predictive marker of malignancy.

**Key words:** gene expression, transcription factor, pluripotency, corpus uteri cancer

**For citation:** Kutilin D.S., Nikitin I.S., Kit O.I. Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):57–62.

### Введение

Рак тела матки – наиболее распространенная инвазивная злокачественная опухоль матки у женщин, во всем мире ежегодно ее диагностируют более чем у 300 тыс. женщин [1]. Поиск высокоспецифичных молекулярных онкомаркеров для данного заболевания остается приоритетной задачей, что подтверждается результатами ряда исследований, посвященных этому направлению [2, 3]. Опухолевые клетки характеризуются нарушением функционирования сигнальных путей, обеспечивающих повышение пролиферативной активности и иммортализацию клеток [4]. Транскрипционные факторы, кодируемые генами *OCT4* и *SOX2*, участвуют в регуляции работы человеческих эмбриональных стволовых клеток и поэтому могут играть важную роль в прогрессии опухолей. Ген *OCT4* кодирует транскрипционный фактор, участвующий в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток, и широко используется как маркер для недифференцированных клеток [5]. *SOX2* кодирует фактор транскрипции, который имеет большое значение для поддержания самообновления недифференцированных эмбриональных стволовых клеток, а его гиперэкспрессия активизирует миграцию опухолевых клеток. В эмбриональных стволовых клетках *SOX2* контролирует экспрессию *OCT4* [6]. Транскрипционный фактор, кодируемый геном *C-MYC*, регулирует экспрессию до 15 % всех генов, включая гены, контролирующие репликацию ДНК [7]. Мутантные версии гена *Мус* обнаружены во многих опухолях, при этом ген экспрессируется постоянно, что приводит к нарушению регуляции активности многих генов, в том числе отвечающих за пролиферацию и дифференцировку клеток, а также самообновление стволовых клеток [8].

Скрининг экспрессии генов транскрипционных факторов, ответственных за контроль над пролиферацией и дифференцировкой клеток тканей эндометрия, позволит осуществить создание панели специфичных онкомаркеров и исследовать фундаментальные механизмы онкотрансформации.

**Цель исследования** – анализ изменений в экспрессии транскрипционных факторов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* в тканях тела матки в процессе их малигнизации.

### Материалы и методы

Для исследования использовали биоптаты тканей матки (опухолевые и условно-нормальные) 45 пациентов в возрасте 37–75 лет с гистологически подтвержденным диагнозом рака тела матки.

Фрагменты ткани измельчали и растирали в фарфоровых ступках в лизирующем растворе, содержащем 4 М гуанидинтиоцианата, 25 мМ цитрата натрия,

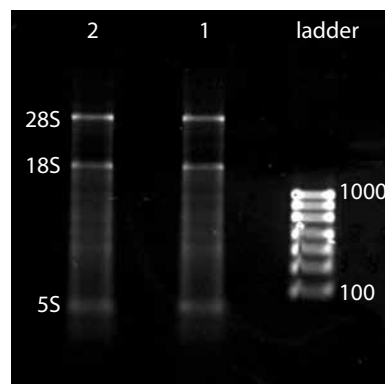
0,5 % саркозила и 0,1 М 2-меркаптоэтанола. Дальнейшее выделение РНК из тканей выполняли методом гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформной экстракции и обрабатывали ДНКазой 1 для удаления геномной ДНК [9]. Перед реакцией обратной транскрипции для проверки качества выделенной РНК проводили электрофорез в 2 % агарозном геле в ТВЕ-буфере [10] (рис. 1).

Синтез комплементарной ДНК выполняли с использованием коммерческих наборов РЕВЕРТА-Л (Интерлабсервис, Россия) [11].

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили определение относительной экспрессии 3 генетических локусов, кодирующих транскрипционные факторы *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC*. Дизайн праймеров для *OCT4* и *SOX2* осуществляли с применением референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST. В качестве референсного гена использовали ген *ACTB*, последовательности прямого и обратного праймеров к которому были подобраны нами ранее [9] (см. таблицу).

Принцип использованного метода заключается в анализе сигналов амплификации генов-мишеней и референсного гена в исследуемых пробах. Анализируемые последовательности генетических локусов амплифицировали в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1х ПЦР-буфер и 1 ед. акт. ДНК-полимеразы *Thermusaquaticus*, краситель EVA-Green и по 400 нМ прямого и обратного праймеров. Количественную ПЦР-РВ амплификацию проводили на термоциклере CFX96 (BioRad, США). Относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле  $RE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  [12].

Статистический анализ выполняли с помощью прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013



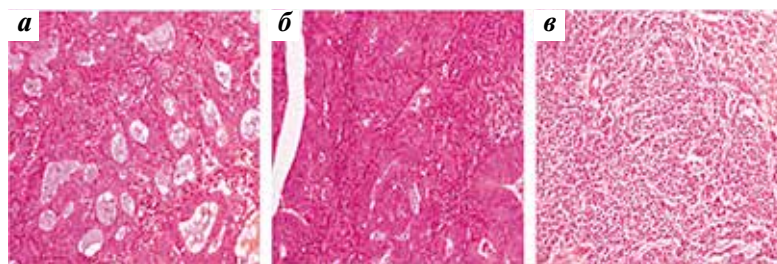
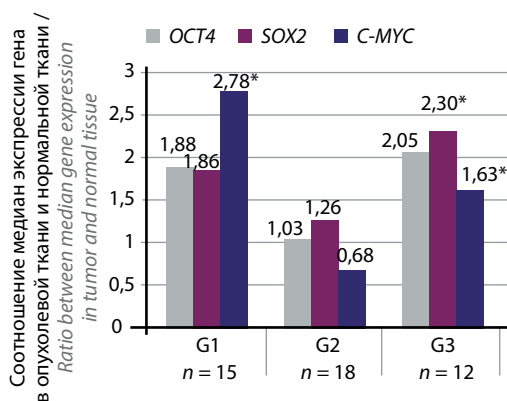
**Рис. 1.** Электрофорез РНК в 2 % агарозном геле (соотношение 1:1 интенсивности полос 18S и 28S свидетельствует о пригодном для анализа экспрессии генов качестве РНК)

**Fig. 1.** RNA electrophoresis in 2 % agarose gel (1:1 intensity ratio shows usability RNA for gene expression analysis)

## Характеристика праймеров

## Primer characteristics

Наименование праймеров Primer name	№ NCBI GenBank NCBI GenBank No.	Последовательность Sequence
<i>OCT_4_F</i>	NM_002701.5	AAT TTG TTC CTG CAG TGC CC
<i>OCT_4_R</i>		TAC AGA ACC ACA CTC GGA CC
<i>C-MYC_F</i>	NM_002467.4	CAC CAC CAG CAG CGA CT
<i>C-MYC_R</i>		GAC TCT GAC CTT TTG CCA GGA
<i>SOX2_F</i>	NM_003106.3	CCC CTG TGG TTA CCT CTT CC
<i>SOX2_R</i>		CTG ATC ATG TCC CGG AGG TC
<i>ACTB_F</i>	NM_001101.3	AAC CGC GAG AAG ATG ACC C [9]
<i>ACTB_R</i>		AGC ACA GCC TGG ATA GCA AC [9]



**Рис. 2.** Сравнение соотношения экспрессии генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* в опухолевой ткани к условно-нормальной ткани матки у пациенток с аденокарциномой матки стадий дедифференцировки G1, G2 и G3. Представлены фотографии гистологических препаратов, соответствующих стадиям G1 (а), G2 (б) и G3 (в) ( $\times 200$ ). \*Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) между экспрессией соответствующего гена в опухоли и в нормальной ткани

**Fig. 2.** Comparison of *OCT4*, *SOX2* and *C-MYC* gene expression ratios in tumor tissue and relatively normal uterine tissue in patients with G1, G2 and G3 dedifferentiation stages of uterine adenocarcinoma. Photos of histological samples are presented corresponding to G1 (a), G2 (б) and G3 (в) ( $\times 200$ ). \*Significant differences ( $p < 0.05$ ) between gene expression in tumor and normal tissue

и Statistica 8.0. Оценку различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и корреляционного анализа (коэффициент корреляции Пирсона,  $r$ ) для порогового уровня статистической значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты

С учетом роли в клеточной дифференцировке выделенных для исследования генов было проведено ранжирование имеющейся выборки пациенток по стадиям дедифференцировки клеток опухолей G1, G2 и G3.

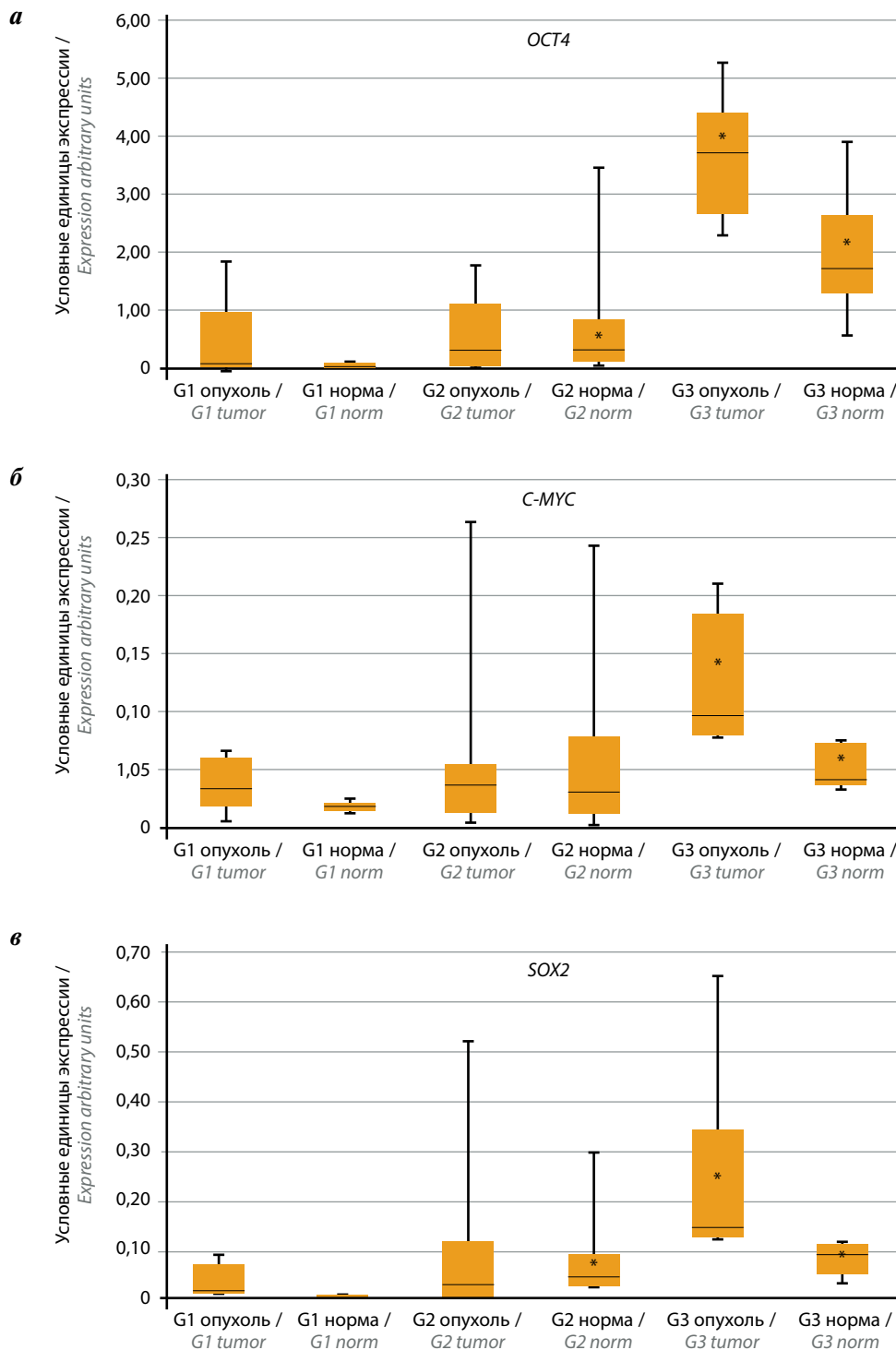
У группы пациенток с аденокарциномой тела матки стадии дедифференцировки G1 в возрасте 45–68 лет обнаружено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение экспрессии гена *SOX2* на 178 %, у пациенток с аденокарциномой тела матки стадии дедифференцировки G2 в возрасте 37–69 лет не выявлено статистически значимого изменения экспрессии исследуемых генетических локусов, а у пациенток с аденокарциномой тела матки стадии дедифференцировки G3 в возрасте

55–75 лет обнаружено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение экспрессии генов *SOX2* и *C-MYC* на 63 и 130 % соответственно в опухолевой ткани матки по отношению к условно-нормальной (рис. 2).

Следует отметить, что экспрессия пар генов *OCT4* и *SOX2*, *OCT4* и *C-MYC*, *C-MYC* и *SOX2* и в условно нормальной, и в опухолевой тканях разной степени дифференцировки обладает сильной положительной корреляцией, варьирующей от +0,940 до +0,998.

Также обнаружено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение экспрессии генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* в 35, 7 и 2 раза соответственно в опухолевой ткани на стадии дедифференцировки G3 по отношению к экспрессии этих генов в опухолевой ткани на стадии дедифференцировки G1 и увеличение экспрессии генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* в 32, 12 и 2 раза соответственно в нормальной ткани на стадии дедифференцировки G3 по отношению к экспрессии этих генов в нормальной ткани на стадии дедифференцировки G1 (рис. 3).





**Рис. 3.** Сравнение относительной экспрессии в опухолевой и условно-нормальной ткани матки у пациенток с аденокарциномой матки стадий дедифференцировки G1, G2 и G3: а – гена OCT4; б – гена C-MYC; в – гена SOX2. \*Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) по отношению к степени дедифференцировки G1

**Fig. 3.** Comparison of relative expression in tumor tissue and relatively normal uterine tissue in patients with G1, G2 and G3 dedifferentiation stages of uterine adenocarcinoma: а – OCT4 gene; б – C-MYC gene; в – SOX2 gene. \*Significant differences ( $p < 0.05$ ) relative to dedifferentiation grade G1

### Обсуждение

В последние годы результаты многих исследований показали, что нарушение экспрессии некоторых связанных со стволовыми клетками транскрипционных факторов, таких как OCT4, Sex-Z, Nanog и Klf4, может

способствовать развитию опухолевого процесса в различных тканях [2, 13].

Sex-determining region Y (SRY)–Box2 (SOX2) является членом семейства транскрипционных факторов SOX, отвечающих за координацию такой функции,

как ограничение дифференцировки. Уровень экспрессии *SOX2* строго регулируется для обеспечения нормального развития эмбриона. Снижение экспрессии *SOX2* способствует дифференцировке эмбриональных стволовых клеток в различные типы клеток.

*SOX2* – ключевой фактор, способный индуцировать плюрипотентность в соматических клетках наряду с *Klf4*, *OCT3/4* и *C-MYC*. Это также 1 из 4 транскрипционных факторов, способных перепрограммировать соматические клетки человека в плюрипотентные стволовые клетки с характеристиками эмбриональных стволовых клеток [14].

*OCT4* является ядерным транскрипционным фактором семейства POU, который играет критическую роль в самообновлении и плюрипотентности. На начальных этапах эмбрионального развития в плюрипотентных клетках *OCT4* и *SOX2* функционируют совместно, стимулируя транскрипцию нескольких генов-мишеней, включая *NANOG*, *FGF-4*, *UTF1*, *FBX15*, *microRNA-302* и даже самих *SOX2* и *OCT4*.

Сверхэкспрессия транскрипционных факторов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* также может обеспечивать приобретение клетками плюрипотентности. Однако до настоящего времени не было опубликовано исследований о потенциальной функции *SOX2* при раке эндометрия [15]. К. Pityński и соавт. использовали иммуногистохимический метод для оценки уровней биосинтеза *SOX2* и *OCT4* в качестве маркеров стволовых клеток в 69 образцах опухолевых тканей тела матки на ранней стадии [2]. Также была оценена коэкспрессия *SOX2* и *OCT4* и их корреляция с клинико-патологическими признаками. Наивысшая экспрессия *SOX2* была обнаружена в образцах со стадией дедифференцировки G3 по сравнению с образцами G2 и G1, при этом различий в экспрессии *OCT4* по стадиям дедифференцировки не было отмечено. Это частично согласуется с результатами, полученными в нашем исследовании: показано увеличение экспрессии гена *SOX2* от стадии G1 к G2 на 33 % и от стадии G2 к G3 на 80 %, при этом синхронное увеличение экспрессии *SOX2* наблюдалось и в прилежащей условно-нормальной ткани. Однако уровень экспрессии *SOX2* был статистически значимо

выше в опухолевой ткани по сравнению с прилежащей условно-нормальной тканью (для G1 и G2).

Также нами были обнаружены различия в экспрессии *OCT4* по стадиям дедифференцировки опухолевой ткани тела матки, что согласуется с результатами, описанными в работах L. You и соавт. и N. Hatefi и соавт. [16, 17], в которых показано, что экспрессия *OCT4* в опухолевой ткани коррелирует со стадией дедифференцировки, размером опухоли и может служить независимым прогностическим биомаркером.

В работе С. J. Lee и соавт. экспрессия *SOX2* и *MYC*, но не *OCT4* и *NANOG*, коррелирует с плохим прогнозом, при этом экспрессия *SOX2* отрицательно коррелирует с уровнем *MYC* [18]. В нашем же исследовании экспрессия пар генов *OCT4* и *SOX2*, *OCT4* и *C-MYC*, *C-MYC* и *SOX2* в опухолевых тканях разной стадии дедифференцировки характеризовалась сильной положительной корреляцией, что, по-видимому, отражает синхронную активацию данных транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки, которые, в свою очередь, активируют ряд ключевых генов разных сигнальных путей.

### Заключение

Таким образом, обнаруженное изменение транскрипционной активности генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* ассоциировано с «озлокачествлением» опухолевых клеток тела матки в процессе прогрессии опухоли, что делает возможным их использование в качестве дифференциальных маркеров трансформации клеток, а изменение экспрессии гена *SOX2* – и в качестве предиктивного маркера малигнизации. Из исследованных транскрипционных факторов по мере снижения степени дифференцировки опухолевых клеток наиболее значительно свою экспрессию увеличивает ген *OCT4*, что подтверждает его статус маркера недифференцированных клеток. По мере снижения степени дифференцировки опухолевых клеток изменение экспрессии генов *OCT4*, *SOX2* и *C-MYC* затрагивает и прилежащую условно-нормальную ткань тела матки, но с меньшей интенсивностью, особенно на поздних этапах малигнизации.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С. и др. Аберрантная транскрипционная активность апоптоз-регулирующих генов при малигнизации тканей тела матки. Молекулярная медицина 2018;16(1):25–32. DOI: 10.29296/24999490-2018-01-05. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S. Aberrant transcriptional activity of apoptosis-regulating genes in malignant neoplasm of corpus uteri. Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine 2018;16(1):25–31 (In Russ.).]
2. Pityński K., Banas T., Pietrus M. et al. SOX-2, but not Oct4, is highly expressed in early-stage endometrial adenocarcinoma and is related to tumour grading. Int J Clin Exp Pathol 2015;8(7):8189–98.
3. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С. и др. Изменение экспрессии эстроген-регуляторных генов при малигнизации тканей тела матки. Кубанский научный медицинский вестник 2016;157(2):84–90. DOI: 10.25207/1608-6228-2016-2-84-90. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S. et al. Changes in expression of estrogen-regulatory genes in malignancy uterine tissues. Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin 2016;(2):84–90. (In Russ.).]
4. Zhu C.Q., Shih W., Ling C.H., Tsao M.S. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase

- approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 2006;59(8):790–800. DOI: 10.1136/jcp.2005.031351. PMID: 16873561.
5. Chen Z., Xu W.R., Qian H. et al. Oct4, a novel marker for human gastric cancer. *J Surg Oncol* 2009;99(7):414–19. DOI: 10.1002/jso.21270. PMID: 19347886.
  6. Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y. et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):625–35. DOI: 10.1038/ncb1589. PMID: 17515932.
  7. Gearhart J., Pashos E.E., Prasad M.K. Pluripotency redux – advances in stem-cell research. *N Engl J Med* 2007;357(15):1469–72. DOI: 10.1056/NEJMp078126. PMID: 17928593.
  8. Chen Y., McGee J., Chen X. et al. Identification of druggable cancer driver genes amplified across TCGA datasets. *PLoS One* 2014;9(5):e98293. DOI: 10.1371/journal.pone.0107646. PMID: 24874471.
  9. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С. и др. Способ прогнозирования рецидивов рака тела матки на основании уровня экспрессии генов *PTEN* и *CYP1B1*. Патент на изобретение RUS 2605302, 10.11.2015. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S. et al. Method of recurrent endometrial cancer prediction based on *PTEN* and *CYP1B1* genes expression level. Patent for invention RUS 2605302, 10.11.2015. (In Russ.)].
  10. Кутилин Д.С. Молекулярные механизмы реализации геропротекторной активности пептида дельта-сна. Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.04. Южный федеральный университет. Ростов-на-Дону, 2013. [Kutilin D.S. Molecular mechanisms for the implementation of geroprotective activity of the delta-sleep peptide. Author's abstract of thesis ... of candidate biological sciences: 03.01.04. South Federal University. Rostov-on-Don, 2013. (In Russ.)].
  11. Кит О.И., Водолажский Д.И., Димитриади С.Н. и др. Активность проапоптотических генов повышается после ишемии/реперфузии почки. Молекулярная биология 2017;51(3):502–11. DOI: 10.7868/S0026898417030090. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Dimitriadi S.N. et al. The activity of proapoptotic genes increases after renal ischemia/reperfusion. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2017;51(3):445–52. (In Russ.)]
  12. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
  13. Hubbard S., Gargett C. A cancer stem cell origin for human endometrial carcinoma? *Reproduction* 2010;140(1):23–32. DOI: 10.1530/REP-09-0411. PMID: 20089663.
  14. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663–76. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024. PMID: 16904174.
  15. Rizzino A. The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem Cells* 2013;31(6):1033–9. DOI: 10.1002/stem.1352. PMID: 23401375.
  16. You L., Guo X., Huang Y. Correlation of cancer stem-cell markers OCT4, SOX2, and NANOG with clinicopathological features and prognosis in operative patients with rectal cancer. *Yonsei Med J* 2017;59(1):35–42. DOI: 10.3349/ymj.2018.59.1.35. PMID: 29214774.
  17. Hatefi N., Nouraei N., Parvin M. et al. Evaluating the expression of OCT4 as a prognostic tumor marker in bladder cancer. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15(6):1154–61. PMID: 23653844.
  18. Lee C.J., Sung P.L., Kuo M.H. et al. Crosstalk between SOX2 and cytokine signaling in endometrial carcinoma. *Sci Rep* 2018;8(1):17550. DOI: 10.1038/s41598-018-35592-0. PMID: 30510261.

#### Вклад авторов

Д.С. Кутилин: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи, разработка праймеров, проведение молекулярно-генетического исследования, анализ данных;

И.С. Никитин: сбор биологического материала, его описание, гистологическая верификация, подготовка к молекулярно-генетическому исследованию, анализ данных;

О.И. Кит: разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи.

#### Authors' contributions

D.S. Kutilin: developing the research design, article writing, primer development, molecular and genetic analysis, data analysis;

I.S. Nikitin: acquirement of biological material and its description, histological verification, preparation for molecular and genetic analysis, data analysis;

O.I. Kit: developing the research design, article editing, reviewing of publications of the article's theme.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Д.С. Кутилин/D.S. Kutilin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

О.И. Кит/O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Informed consent.** All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 31.01.2019. **Принята к публикации:** 19.03.2019.

**Article received:** 31.01.2019. **Accepted for publication:** 19.03.2019.

# Изучение взаимодействия белков внеклеточного матрикса с рецепторами CD133<sup>+</sup> стволовых клеток и CD133<sup>-</sup> дифференцированных клеток глиомы

В.Е. Шевченко<sup>1</sup>, И.С. Брюховецкий<sup>2,3</sup>, Е.А. Савченко<sup>4</sup>, Н.Е. Арноцкая<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>Школа биомедицины ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»; Россия, 690091 Владивосток, ул. Суханова, 8;

<sup>3</sup>ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения РАН; Россия, 690059 Владивосток, ул. Пальчевского, 17;

<sup>4</sup>ООО «АПТО-ФАРМ»; Россия, 115446 Москва, Коломенский проезд, 13А

**Контакты:** Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

**Введение.** Лечение мультиформной глиобластомы остается малоэффективным из-за быстроразвивающихся рецидивов опухоли, обусловленных высоким опухолевым потенциалом, устойчивостью к химиолучевой терапии и повышенной диссеминацией стволовых клеток глиомы (СКГ). Молекулярные механизмы взаимодействия этих клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ) практически не изучены. В настоящее время также не ясно, чем отличается сигнализ ВКМ-рецепторного взаимодействия (ВКМ-РВ) для СКГ и дифференцированных клеток глиомы (ДКГ).

**Цель исследования** – методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучить экспрессию детерминант сигнального каскада ВКМ-РВ в CD133<sup>+</sup> СКГ и CD133<sup>-</sup> ДКГ.

**Результаты.** Идентифицированы 1990 белков, 18 из которых связаны с процессом ВКМ-РВ. Обнаружена положительная регуляция 14 белков ВКМ-РВ в CD133<sup>+</sup> СКГ по сравнению с CD133<sup>-</sup> ДКГ, 10 из которых имели повышенную экспрессию более чем в 2 раза. Отмечено повышение в CD133<sup>+</sup> СКГ экспрессии 4 белков, активирующих сигнальный каскад ВКМ-РВ.

**Заключение.** Установлены важные закономерности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов к обнаружению потенциальных мишеней для терапии мультиформной глиобластомы.

**Ключевые слова:** внеклеточный матрикс, стволовые клетки глиомы, мультиформная глиобластома, протеом, масс-спектрометрия

**Для цитирования:** Шевченко В.Е., Брюховецкий И.С., Савченко Е.А., Арноцкая Н.Е. Изучение взаимодействия белков внеклеточного матрикса с рецепторами CD133<sup>+</sup> стволовых клеток и CD133<sup>-</sup> дифференцированных клеток глиомы. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(1):63–72.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-63-72

## Study of interaction between extracellular matrix proteins and receptors of CD133<sup>+</sup> stem cells and CD133<sup>-</sup> differentiated glioma cells

V.E. Shevchenko<sup>1</sup>, I.S. Bryukhovetskiy<sup>2,3</sup>, E.A. Savchenko<sup>4</sup>, N.E. Arnotskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>School of Biomedicine, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok 690091, Russia;

<sup>3</sup>National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences; 17 Pal'chevskogo St., Vladivostok 690059, Russia;

<sup>4</sup>Limited Liability Company "APTO-FARM"; 13A Kolomenskiy Proezd, Moscow 115446, Russia

**Background.** Treatment of glioblastoma multiforme remains little effective due to the rapidly developing recurrence of the tumor, due to its high tumorigenic potential, resistance to chemoradiation therapy and increased dissemination of glioma stem cells (GSC). Molecular mechanisms of these cell interaction with extracellular matrix (ECM) are practically not studied. At present, it is also not clear the signaling of the ECM-receptor interaction (ECM-RI) differs for GSC and differentiated glioma cells (GDC).

**Objective:** using high-resolution proteomic mass spectrometry to study the determinant expression of the ECM-receptor interaction signaling cascade in CD133<sup>+</sup> GSC and CD133<sup>-</sup> GDC.

**Results.** 1990 proteins are identified, 18 of which are associated with the ECM-RI process. Positive regulation of 14 ECM-RI proteins was found in CD133<sup>+</sup> GSC compared with CD133<sup>-</sup> GDC, ten had more than 2 times increased expression. Increase in the CD133<sup>+</sup> GSC level of 4 proteins activating the ECM-RI signaling cascade was noted.

**Conclusion.** Important regularities are determined that could be used for the development of new approaches for detection of potential therapy targets of glioblastoma multiforme.



**Key words:** extracellular matrix, glioma stem cells, glioblastoma multiforme, proteome, mass-spectrometry

**For citation:** Shevchenko V.E., Bryukhovetskiy I.S., Savchenko E.A., Arnotskaya N.E. Study of interaction between extracellular matrix proteins and receptors of CD133<sup>+</sup> stem cells and CD133<sup>-</sup> differentiated glioma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):63–72.

### Введение

Мультиформная глиобластома (МГБ) – первичная высокоинвазивная глиальная опухоль головного мозга человека с крайне неблагоприятным прогнозом. Каждый год во всем мире диагностируется около 240 тыс. случаев опухолей головного мозга, большинство из которых составляет МГБ [1]. Несмотря на прогресс, достигнутый в терапии рака, лечение МГБ остается малоэффективным из-за быстроразвивающихся рецидивов опухоли [2]. Раковые клетки, выходящие из первичной опухоли, быстро проникают в нормальную паренхиму головного мозга и образуют рецидивы. Такие инвазивные клетки относительно устойчивы к радио- и химиотерапии [2], что еще более усложняет лечение этого заболевания.

Миграция и инвазия клеток МГБ регулируются несколькими факторами, включающими изменения как в самой мигрирующей клетке, так и в микроокружении опухоли. Клеточные и молекулярные механизмы агрессивной инвазии клеток МГБ малоизучены и требуют дополнительных исследований для адаптации будущей терапии МГБ к таргетированию инвазивных клеток. Считают, что, в отличие от других солидных злокачественных опухолей, клетки МГБ не используют внутрисосудистые или лимфатические пути для миграции [3], а перемещаются через внеклеточное пространство мозговой ткани [4, 5]. Этот процесс инвазии отличается от процесса миграции, так как клетки МГБ пересекают тканевые барьеры посредством как адгезии, так и деградации внеклеточного матрикса (ВКМ), ремоделирования их цитоскелета и клеточного объема [4, 5].

Хорошо известно, что отдельные раковые клетки могут инвазировать, используя мезенхимальный или амeboидный способ перемещения, или диссеминировать из исходной массы опухоли в виде кластеров [4]. Клетки МГБ в основном используют 1-й тип миграции, наиболее эффективный при их перемещении из основной опухолевой массы [6]. Эти одиночные опухолевые клетки не детектируются современными диагностическими методами визуализации и могут давать опухолевые рецидивы. Такой тип миграции напоминает инвазию нейтральных стволовых клеток в период эмбрионального развития или во время процессов репарации в поврежденных тканях взрослого мозга [7].

Адгезия клеток к белкам ВКМ приводит к образованию клеточно-матриксных точечных контактов, известных как фокальная адгезия, которая обеспечивает взаимодействие клеток со своей микроокружением и играет важную роль в процессах инвазии и метастазирования раковых клеток, включая МГБ [8]. Фокаль-

ная адгезия выполняет свою структурную и сигнальную роль посредством связывания ВКМ с актиновым цитоскелетом клеток, генерируя силы натяжения, необходимые для миграции клеток и ее регулирования [9].

Инвазивность МГБ и радио-/химиорезистентность заметно коррелируют с субпопуляцией стволовых клеток глиомы (СКГ) [10, 11], способных самообновляться, инициировать и поддерживать рост опухоли, образуя рецидивы [12]. Двухнаправленный обмен информацией между СКГ и микроокружением опухоли регулирует не только их свойства стволовости, но способствует пролиферации, ангиогенезу и инвазии [13].

Несмотря на то что инвазивная природа клеток МГБ связана с резистентностью к терапии, остается неясным, какие молекулярные механизмы включены в инвазию СКГ, являются ли СКГ более инвазивными, чем нестволовые, и не определен их вклад в инвазивный фенотип клеток опухоли. Появляются доказательства того, что протеины, включенные в процессы миграции и инвазии, положительно регулируются в СКГ [14]. Кроме этого, предполагаемые маркеры СКГ обнаружены на переднем крае опухоли [15], что указывает на их участие в процессах инвазии.

Обогащение МГБ опухолевыми стволовыми клетками может происходить либо из-за симметричного деления СКГ, либо путем перепрограммирования нестволовых клеток глиомы, что приводит к фенотипической пластичности в популяции опухоли [16]. Концепция дедифференцировки нестволовых клеток глиомы в СКГ усложнила понимание гетерогенности МГБ, потенциального механизма терапевтического рецидива, резистентности к противоопухолевым терапиям и проблем, связанных с разработкой терапевтических стратегий. В связи с этим становится актуальным сравнение протеомного профиля СКГ и дифференцированных клеток глиомы (ДКГ) для изучения молекулярных механизмов инвазии СКГ, что может привести в дальнейшем к открытию новых терапевтических мишеней, обеспечивающих более эффективные методы лечения этого заболевания.

В настоящем исследовании впервые проведен нано-ВЭЖХ-МС/МС-анализ лизатов CD133<sup>+</sup>- и CD133<sup>-</sup>-клеток, полученных из глиомасфер линии клеток U87MG, для сравнения протеомов СКГ и ДКГ. Основное внимание было уделено дифференциально экспрессированным белкам (ДЭБ) ВКМ-рецепторного взаимодействия (ВКМ-РВ), играющего важную роль в процессах диссеминации опухолевых клеток. Мы идентифицировали 1990 белков, 18 из которых связаны с ВКМ-РВ. Обнаружена положительная регуляция 14 белков ВКМ-РВ в CD133<sup>+</sup> СКГ по сравнению

с CD133<sup>-</sup> ДКГ, 1 из которых имел повышенную экспрессию более чем в 2 раза. Отмечено увеличение в CD133<sup>+</sup> СКГ уровней 4 белков, активирующих сигналинг ВКМ-РВ. Полученные данные и выявленные закономерности, на наш взгляд, указывают на возможность таргетирования сигнального каскада ВКМ-РВ в CD133<sup>+</sup> СКГ, что может использоваться при разработке новых терапевтических схем для лечения МГБ.

### Материалы и методы

**Реактивы.** Для всех процедур использовали дистиллированную воду, очищенную и обессоленную с помощью Milli-Q (Millipore Corporation, США). Ацетонитрил (ACN) HPLC gradient grade был получен из Prolabo (США); 98–100 % муравьиная кислота (FA) – из Merck (США); гидрокарбонат аммония NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, дитиотреитол, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), трис-(2-карбоксиэтил)фосфин (TCPEP), трифторуксусная кислота (TFA) и мочевины – из Fluka (США); 99,7 % уксусная кислота, 99,5 % 2,2,2-трифторэтанол (TFE), иодацетамид и трипсин, метилированный по лизинам, – из Sigma-Aldrich (США); соляная кислота (чистая) и KCl (чистый) – из Химмед (Россия).

**Клеточные культуры.** CD133<sup>+</sup> СКГ и CD133<sup>-</sup> ДКГ получали из клеточной культуры глиобластомы человека линии U87MG (American Type Culture Collection, Manassas, VA, США) ранее описанным методом [17]. Клетки культивировали в культуральной среде DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США) с низким содержанием глюкозы и с 10 % FBS (фетальная бычья сыворотка) при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO<sub>2</sub>. Адгезивные клетки культивировали до достижения 80 % конfluence и пассировали из расчета 1:3. Для получения глиомасфер опухолевые клетки U87MG ресуспендировали в бессывороточной среде DMEM (Gibco, Life Technologies, Россия) с добавлением L-глутамина (2 мМ, Life Technologies, Россия), B27 (Life Technologies, Россия), базового фактора роста фибробластов (bFGF, 20 нг/мл, Sigma-Aldrich, США), эпидермального фактора роста (EGF, 20 нг/мл, Sigma-Aldrich, США), пенициллина/стрептомицина (100 ед/мл), гепарина (5 мкг/мл, ОАО «Синтез», Россия) и затем культивировали в 6-луночной планшете из неадгезивного пластика при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % содержанием CO<sub>2</sub>. Новые факторы роста добавляли каждые 3 дня. Проводили несколько пассажей (1 раз в неделю) для увеличения количества клеток [18]. При достижении достаточного количества клеток (порядка 10<sup>6</sup> клеток) CD133<sup>+</sup> СКГ выделяли методом иммуносортинга, используя магнитные шарики с иммобилизованными на них антителами к CD133 (CD133 MicroBeadKit (Miltenyi Biotec, Германия)) в соответствии с рекомендациями производителя. При нанесении клеточной суспензии на колонку давали CD133<sup>+</sup> СКГ сначала связаться с антителами на магнитных шариках (50 нм) при инкубировании

клеток в присутствии блокирующего агента в течение 30 мин при +4 °С, а CD133<sup>-</sup> ДКГ – свободно пройти через колонку. Как только несвязавшиеся CD133<sup>-</sup> ДКГ элюировали из колонки, колонку удаляли из магнитного поля клеточного сепаратора, а CD133<sup>+</sup> СКГ вымывали с помощью буфера [18] и культивировали в среде, используемой ранее. Чистоту CD133<sup>+</sup> СКГ оценивали методом проточной цитометрии с CD133-антителами (5–10 мкг/мл, Miltenyi Biotec, Германия) и она превышала 90 % [18]. Дополнительно проводили иммуногистохимическое окрашивание CD133<sup>+</sup> СКГ для выявления маркеров Sox2 и нестина.

### Приготовление образцов для масс-спектрометрии.

Два образца клеток глиомасфер (CD133<sup>-</sup> и CD133<sup>+</sup>-клетки) криоконсервировали в фосфатном буферном растворе при температуре –80 °С до использования. После оттаивания клетки лизировали с помощью Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Лизаты опухолевых клеток подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений ранее описанным методом [18]. После ферментативного расщепления (трипсинолиза) образцов лизатов высушенных клеток [18] 4 мкл раствора пептидов анализировали методом нано-ВЭЖХ-МС/МС для подтверждения полноты трипсинолиза. Образцы концентрировали при температуре 30 °С в центрифужном концентраторе Labconco CentriVap для полного удаления бикарбоната аммония.

Триптические пептиды растворяли в мобильной фазе (30 % ацетонитрила, 70 % воды и 0,1 % муравьиной кислоты, pH 2,7) и разделяли на 24 фракции с использованием хроматографа Dionex Ulti Mate 3000 (Dionex, США), снабженного коллектором фракций и катионообменной колонкой MIC-10-CP (материал Poros 10S, 1 мм × 10 см, Thermo Fisher Scientific, Inc.) [18]. Полученные фракции концентрировали при температуре 30 °С в центрифужном концентраторе и повторно разбавляли 100 мкл 0,1 % муравьиной кислоты.

**Масс-спектрометрический анализ.** Анализ триптических пептидов проводили с использованием нано-ВЭЖХ-Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометра LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Inc.) с источником ионизации NanoSpray [18]. Для обработки масс-спектрометрических данных применяли программное обеспечение MaxQuant (версия 1.6.1.0; Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Германия). Таблицу полученных белков обрабатывали в программе Perseus v1.5.1.6 для аннотирования и удаления белков-контaminантов и ложноположительных идентификаций, а также для определения статистической значимости различий в уровнях белков, полученных методом *label-free*. Значимыми считали различия при уровне достоверности  $p < 0,05$  для парного t-критерия Стьюдента.

Аннотирование биологических и молекулярных функций и сигнальных путей белков проводили с по-

мощью баз данных PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>), Gene-Ontology (<http://www.geneontology.org/>), Swiss-Prot ([www.uniprot.org/uniprot/](http://www.uniprot.org/uniprot/)) и KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Анализ сети PPI (белок-белковых взаимодействий) выполняли с использованием базы данных STRING v10 (<https://string-db.org>).

### Результаты

Для лучшего понимания биологических процессов и сигнальных путей, отличающих СКГ от дифференцированных опухолевых клеток, был проведен протеомный анализ лизатов этих клеток. Мы использовали *label-free* количественный протеомный нано-ВЭЖХ-МС/МС-метод для обнаружения и сравнения ДЭБ в 2 образцах (в триплетях): CD133<sup>+</sup> СКГ и CD133<sup>-</sup> ДКГ. Протеомный анализ триптических пептидов с помощью программного обеспечения MaxQuant идентифицировал в общей сложности 1990 белков путем сопоставления 47978 МС/МС-спектров с пептидными последовательностями в базе данных Swiss-Prot\_human с ложным уровнем обнаружения (FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов.

Дополнительная обработка данных с помощью программы Perseus идентифицировала следующее количество белков: Sample01 (CD133<sup>+</sup> СКГ) – 1891 белок по 9124 пептидам (из них 7906 уникальных пептидов); Sample02 (CD133<sup>-</sup> ДКГ) – 1748 белков по 8816 пептидам (из них 7598 уникальных пептидов). Из них 97,6 % были идентифицированы по совпадению двух и более пептидов и 2,4 % – по совпадению одного пептида. Процент сиквенс-покрытия исследуемых белков варьировал от 0,2 до 77,0 %, а именно: 1496 белков с сиквенс-покрытием до 20 %; 414 – от 20 до 40 %; 63 – от 40 до 60 %; 17 – от 60 до 77,3 %. Коэффициенты корреляции Пирсона между образцами CD133<sup>+</sup> СКГ и CD133<sup>-</sup> ДКГ варьировали от 0,74 до 0,93.

Белки, идентифицированные в образцах CD133<sup>+</sup> СКГ и CD133<sup>-</sup> ДКГ, анализировали на процент перекрытия. Идентифицированные протеины показали высокий процент перекрытия для двух клеточных популяций: 1649 белков (83 % из 1990 белков) были обнаружены во всех клеточных лизатах, 242 белка (12 %, 525 пептидов) – только в CD133<sup>+</sup> СКГ, а 99 белков (5 %, 217 пептидов) – только в CD133<sup>-</sup> ДКГ.

Из этих белков 589 были ДЭБ и имели статистически значимые изменения ( $p < 0,05$ ) экспрессии в клеточной линии CD133<sup>+</sup> СКГ по сравнению с CD133<sup>-</sup> ДКГ с кратностью изменения  $>2$  или  $<0,5$ . Использование 1 в качестве порогового логарифмического соотношения показало, что экспрессия 358 белков была выше, а экспрессия 231 белка была ниже в CD133<sup>+</sup> СКГ по сравнению с CD133<sup>-</sup> ДКГ. Повышение экспрессии более чем на порядок наблюдали у 60 ДЭБ, включая KIF6, MYH11, DLD, NPC2, TMEM165, UBXN1, BLVRA, H2AFY. Одновременно снижение экспрессии более чем на порядок отмечали для 62 ДЭБ, включая DNX57,

CSA2, KIF7, MYNN, RGPD3, SUMO2, ARHGEF18, SRSF9.

Динамический диапазон для идентифицированных белков составлял 6 порядков (от  $4,1 \times 10^8$  до 363), что позволило выявить низкокопийные белки, такие как гемоксидаза 2, фактор сплайсинга 1, десмоглеин 1, кальпонин 3 и др. Также были идентифицированы прогностические маркеры МГБ (IDH1/2), специфические маркеры мезенхимальных (CD44, интегрин  $\alpha 5$  и  $\beta 1$ ) и прогениторных (член A3 семейства альдегиддегидрогеназы 1) стволовых клеток глиобластомы и маркеры пронеурональной дифференцировки нейтральных прогениторных стволовых клеток (тубулин  $\beta 3$ , нестин).

Полученные данные протеомного картирования белков различных типов клеток были подвергнуты сравнительному биоинформатическому анализу.

В дальнейшем в анализ каждой из групп сравнения были включены только ДЭБ. Каждый из 589 ДЭБ в клеточных линиях CD133<sup>+</sup> СКГ и CD133<sup>-</sup> ДКГ классифицировали по клеточной локализации с использованием открытых баз данных, указанных выше. Если один белок был обнаружен в более чем 1 клеточном компартменте, он также учитывался. Клеточная локализация ДЭБ в основном включала структурные компоненты клетки (GO:0005623; 40,6 %), органеллы (GO:0043226; 28,5 %), протеиновые комплексы (GO:0032991; 18,1 %), мембрану (GO:0016020; 9,4 %). Таким образом, значительная часть белков относилась к внутриклеточной локализации.

Классификация белков по биологическим процессам показала, что большинство ДЭБ вовлечены в метаболический (GO:0008152; 27,5 %) и клеточные (GO:0009987; 32,3 %) процессы, организацию клеточных компонентов или биогенез (GO:0071840; 11,0 %), локализацию (GO:0051179; 7,9 %), биологическую регуляцию (GO:0065007; 6,5 %), ответ на стимулы (GO:0050896; 4,9 %), развитие (GO:0032502; 4,0 %). Основная часть ДЭБ выполняла связывающие (GO:0005488; 38,9 %) и каталитические (GO:0003824; 39,6 %) молекулярные функции, проявляла структурную (GO:0005198; 9,2 %) и транспортную (GO:0005215; 5,9 %) активность. Большинство ДЭБ относились к следующим классам белков: связывающие нуклеиновые кислоты (PC00171; 18,2 %), гидролазы (PC00121; 11,4 %), оксидоредуктазы (PC00176; 9,6 %), ферментативные модуляторы (PC00095; 7,5 %), белки цитоскелета (PC00085; 7,0 %), трансферазы (PC00220; 6,5 %), транскрипционные факторы (PC00218; 5,4 %), сигнальные молекулы (PC00207; 3,5 %).

Учитывая важную роль ВКМ-РВ в инвазии и диссеминации МГБ, мы изучили экспрессию белков, связанных с этим сигналингом. В результате протеомного анализа идентифицированы 18 детерминант сигнального каскада ВКМ-РВ. Увеличенная экспрессия наблюдалась у 14 протеинов ( $p < 0,05$ ), из них 10 ДЭБ имели повышенную экспрессию более чем в 2 раза в CD133<sup>+</sup> СКГ по сравнению с ДКГ (см. таблицу).



Достоверно не изменяли экспрессию 4 протеина (COL6A2, ITGA3, LAMA2, TNC). Дополнительно проанализировали изменение экспрессии белков FERMT2, LOXL2, HDAC2 и FBN1, участие которых в регуляции процесса ВКМ-РВ доказано.

*Детерминанты взаимодействия белков внеклеточного матрикса с рецепторами клеток, экспрессия которых различается ( $p < 0,05$ ) между CD133<sup>+</sup> стволовыми клетками и CD133<sup>-</sup> дифференцированными клетками глиомы*

*Determinants of interaction between extracellular matrix proteins and cell receptors, the expression of which differs ( $p < 0.05$ ) between CD133<sup>+</sup> stem cells and CD133<sup>-</sup> differentiated glioma cells*

Индекс гена Gene index	Название белка Protein name	Число идентифицированных пептидов Number of identified peptides	CD133 <sup>+</sup> стволовые клетки глиомы/CD133 <sup>-</sup> дифференцированные клетки глиомы CD133 <sup>+</sup> glioma stem cells/CD133 <sup>-</sup> differentiated glioma cells
CD44	CD44 антиген CD44 antigen	8	1,54
COL1A1	Коллаген типа 1 $\alpha 1$ Collagen type 1 $\alpha 1$	2	1,52
COL1A2	Коллаген типа 1 $\alpha$ Collagen type 1 $\alpha$	3	1,85
COL6A1	Коллаген типа 4 $\alpha 1$ Collagen type 4 $\alpha 1$	3	8,46
COL6A3	Коллаген типа 4 $\alpha 3$ Collagen type 4 $\alpha 3$	16	2,31
FN1	Фибронектин 1 Fibronectin 1	8	2,26
HMMR	Рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности Hyaluronan-mediated motility receptor	3	1,76
ITGA2	Интегрин $\alpha 2$ Integrin $\alpha 2$	7	2,90
ITGA5	Интегрин $\alpha 5$ Integrin $\alpha 5$	3	3,62
ITGB1	Интегрин $\beta 1$ Integrin $\beta 1$	12	4,50
ITGB3	Интегрин $\beta 3$ Integrin $\beta 1$	9	2,24
ITGAV	Интегрин $\alpha 5$ Integrin $\alpha 5$	2	5,07
LAMB1	Ламинин $\beta 1$ Laminin $\beta 1$	5	8,84
LAMC1	Ламинин $\gamma 1$ Laminin $\gamma 1$	5	2,77

### Обсуждение

При проведении исследования мы использовали глиомасферы, образованные из линии клеток U87MG МГБ человека в суспензионных условиях, в качестве модельной системы и единого источника для получения и изучения CD133<sup>+</sup> СКГ и CD133<sup>-</sup> ДКГ. По предварительным данным, CD133<sup>+</sup> СКГ, полученные из глиомасфер линий клеток первичных глиом, обладали высоким опухолевым потенциалом. Ста CD133<sup>+</sup>-клеток, введенных в мозг ксенографтов, хватало для индукции МГБ, похожей на первоначальную опухоль [19, 20]. CD133<sup>-</sup>-клетки, выделенные из глиомасфер, образованных при культивировании клеток первичной опухоли в адгезивных условиях, также обладали стволовоподобными свойствами, тогда как CD133<sup>-</sup>-клетки МГБ, полученные после CD133<sup>+</sup>-иммуносортинга из суспензии клеток глиомасфер, такими свойствами не обладали, имели очень низкий опухолевый потенциал, не образовывали глиомасфер и несли на своей поверхности маркеры 3 направлений нейтральной дифференцировки [20], что, по мнению ряда исследователей, давало все основания приписать им статус ДКГ [21]. Выход CD133<sup>+</sup> СКГ в наших опытах не превышал 5 %.

В настоящей работе впервые выполнен сравнительный протеомный анализ CD133<sup>+</sup> СКГ и CD133<sup>-</sup> ДКГ. Основное внимание было уделено ДЭБ ВКМ-РВ, играющего важную роль в процессах диссеминации опухолевых клеток. Мы идентифицировали 1990 белков, 18 из них связаны с ВКМ-РВ. Обнаружена положительная регуляция 14 белков ВКМ-РВ в CD133<sup>+</sup> СКГ по сравнению с CD133<sup>-</sup> ДКГ, 10 из которых (COL6A1, COL6A3, FN1, ITGA2, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, LAMB1, LAMC1) имели повышенную экспрессию более чем в 2 раза. Схема белок-белковых взаимодействий идентифицированных детерминант ВКМ-РВ, экспрессия которых статистически значимо ( $p < 0,05$ ) различалась в 2 клеточных популяциях, приведена на рисунке.

По сравнению с ДКГ СКГ проявляют устойчивость к химиолучевой терапии и агрессивную инвазию, часто вследствие кооптации сигнальных путей, относящихся к физиологии нормальных стволовых клеток [19]. После первоначального лечения большинство опухолей МГБ рецидивирует локально в местах, возникающих на периферии полости, полученной после резекции первичной опухоли. Недавно S. Munthe и соавт. сообщили, что клетки глиомы на периферии опухоли имеют фенотип СКГ [22]. СКГ локализованы внутри особых микроокружений, называемых нишами, где поддерживается их стволовость. Инициирование опухоли, выживание и инвазия регулируются динамически сложным взаимодействием между СКГ и различными компонентами микроокружения, включая клетки стромы хозяина [23]. С другой стороны, инвазивная область внешнего края опухоли также представляет собой специфическую среду, которая может стать



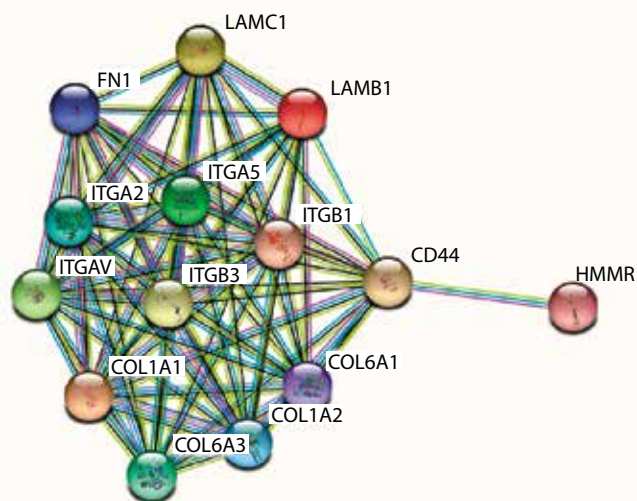


Схема белок-белковых взаимодействий идентифицированных детерминант рецепторного взаимодействия внеклеточного матрикса, экспрессия которых различалась ( $p < 0,05$ ) в  $CD133^+$  стволовых клетках и  $CD133^-$  дифференцированных клетках глиомы

Diagram of protein-protein interactions of identified determinants of receptor interaction of extracellular matrix, expression of which differed ( $p < 0.05$ ) between  $CD133^+$  stem cells and  $CD133^-$  differentiated glioma cells

еще одной нишей для СКГ [24]. В настоящее время мало известно о молекулярных особенностях инвазии СКГ, в том числе из зоны ниш на периферии опухоли.

Результаты исследования МГБ показали, что инвазия опухоли не происходит случайным образом; раковые клетки следуют по отдельным анатомическим структурам и склонны мигрировать вдоль трактов белого вещества, в периваскулярных пространствах, избегая определенных областей серого вещества [25]. Несмотря на обширное вторжение в паренхиму головного мозга и периваскулярные пространства, распространение опухоли вдоль цереброспинальной жидкости наблюдается только в 2 % случаев, а метастазы за пределами нейраксиса отмечались редко [26]. Это говорит в пользу того, что клеточная инвазия глиомы происходит в определенных тканевых отсеках. С учетом того, что внеклеточное пространство намного меньше, чем инвазивная клетка глиомы, и астроцитарные отростки покрывают приблизительно 99 % сосудистой сети [5], вообще удивительно, что опухолевая клетка способна двигаться через мозг. Результаты исследования показали, что клетки МГБ подвергаются нескольким генетическим и фенотипическим изменениям, которые позволяют им переключаться в инвазивный фенотип. Этим изменениям способствуют хемоаттрактантные и репульсивные сигналы, которые возникают при взаимодействии опухолевых клеток с их микро-средой [27].

Фокальная адгезия позволяет клеткам взаимодействовать с окружающей средой и имеет важное значение в эмбриональном развитии, поддержании целостности тканей и функций органов [28]. Фокальная адгезия выполняет структурную и сигнальную роль, связывая белки ВКМ с актиновым цитоскелетом,

и генерирует силу тяги, необходимую для миграции клеток и ее регуляции. Белки фокальной адгезии включают мембранные белки, такие как интегрины, которые соединяют компоненты ВКМ с актиновым цитоскелетом клеток [28].

Интегрины являются гетеродимерными рецепторами клеточной поверхности для гликопротеинов ВКМ и состоят из нековалентно связанных  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, пронизывающих клеточную мембрану. У млекопитающих охарактеризованы 18 $\alpha$ - и 8 $\beta$ -субъединиц, которые образуют 24 уникальных интегриновых гетеродимера, распознающих определенные типы белков ВКМ [29]. Например, Arg-Gly-Asp (RGD), связывающие интегрины, распознают компоненты ВКМ, содержащие RGD-трипептидный мотив, такие как фибронектин, витронектин и фибриноген. Интегрины, связывающие Leu-Asp-Val (LDV), распознают LDV-связанные последовательности во ВКМ, такие как молекула адгезии сосудистых клеток 1 (MAdCAM-1) и молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1); интегрины, содержащие А-домен, взаимодействуют с ламинином и коллагеном; интегрины, не содержащие А-домен, связывают ламинин [30]. Взаимодействие между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами модулируется лигандами ВКМ, тем самым изменяя конформацию интегриновых  $\alpha$ - $\beta$ -гетеродимеров, и распространяется на их цитоплазматические хвосты, связанные с рядом белков фокальной адгезии. Бета-цепь имеет функциональное значение для классификации интегринов. Так, интегрины с  $\beta 1$ - или  $\beta 3$ -цепью преимущественно вовлечены во взаимодействие клетки с ВКМ.

Протеомный анализ идентифицировал 7  $\alpha$ -/ $\beta$ -субъединиц интегриновых рецепторов. Среди них 5 были ДЭБ (ITGA2, ITGA5, ITGB1, ITGB3, ITGAV) и имели повышенную экспрессию в  $CD133^+$  СКГ (см. таблицу). Интегрин ITGA2 образует гетеродимер с субъединицей интегрина  $\beta 1$  в виде трансмембранного рецептора для адгезии клеток к ВКМ. Интегрин  $\alpha 2\beta 1$  является основным рецептором коллагена, а также может связывать ламинин, фибронектин и Е-кадгерин. Он сверхэкспрессирован в различных раковых клетках, но отсутствует или слабо представлен в покоящихся эндотелиальных клетках [31]. Показано, что интегрин  $\alpha 2\beta 1$  способствует миграции раковых клеток и инвазии, а также ангиогенезу. Кроме этого, его профили экспрессии в раковых клетках положительно коррелируют с их агрессивным поведением во время опухолевой прогрессии [32]. Таким образом, ITGA2 может представлять собой перспективную мишень для разработки таргетной терапии рака.

Интегрин  $\alpha 5$  (ITGA5) связывается преимущественно с интегрином  $\beta 1$  и считается одним из наиболее представленных интегринов во ВКМ. Он активно участвует в процессах адгезии, передаче межклеточных сигналов и вовлечен в процессы инвазии и онкогенеза [33]. Миграция, инвазия и пролиферация раковых клеток могут быть значительно супрессированы при

нокауте гена *ITGA5* в МГБ по сравнению с нормальными глиальными клетками [34].

Гипоксия и витронектин могут увеличивать экспрессию интегринового рецептора  $\alpha\beta3$ , в состав которого входит *ITGA5*, на цитоплазматической мембране клеток МГБ и стимулировать их инвазию [35]. Поскольку он в избытке присутствует на эндотелиальных клетках, многие исследования в основном фокусируются на его роли в опухолевом ангиогенезе и эпителиально-мезенхимальном переходе. Однако недавно показано, что повышенная экспрессия интегринового рецептора  $\alpha\beta3$  на клетках МГБ является плохим прогностическим фактором заболевания [36].

Внеклеточный матрикс значительно влияет на клиническое поведение опухолей. Биологические изменения во ВКМ могут непосредственно регулировать адгезию и диссеминацию клеток, поэтому большое внимание уделяется изучению роли ВКМ-связанных белков в опухолевой прогрессии. Количество ВКМ в опухолевой ткани больше, чем в нормальной ткани мозга (50 % против 20 %) [37]. Нерегулируемая динамика ВКМ является отличительной особенностью рака. Состав ВКМ глиомы отличается от такового у здорового мозга, тогда как универсальные компоненты ВКМ экспрессируются равномерно в здоровом мозге, уровни фибриллярных белков и ламинина повышены в МГБ [38]. Ряд белков ВКМ синтезируется самими клетками МГБ, к ним относятся ламинины, коллагены и фибронектин.

Ламинины представляют собой семейство больших внеклеточных гетеротримерных гликопротеинов базальной мембраны и обычно экспрессированы вокруг кровеносных сосудов. Как известно, МГБ – широко васкуляризированный тип опухоли. Ламинины играют важную роль во многих фундаментальных биологических процессах, включая эмбриогенез, опухолевую инвазию, дифференцировку тканей и заживление ран [39]. Как видно из таблицы, экспрессия *LAMB1* и *LAMC1* увеличена в  $CD133^+$  СКГ в 8,84 и 2,77 раза соответственно. Синтез фибриллярных белков, таких как *COL6A1* и *COL6A3*, повышен в  $CD133^+$  СКГ в 8,46 и 2,31 раза соответственно.

Фибронектин (FN1) является важным белком ВКМ, который сверхэкспрессирован при нескольких видах рака и участвует в отдельных этапах онкогенеза. В частности, повышенные уровни FN1 наблюдаются в образцах опухолей и периферической крови [40] у пациентов с глиобластомой. FN1 также модулирует в концентрационной манере адгезию, пролиферацию и дифференцировку СКГ [41]. Экспрессия FN1 увеличивается в мигрирующем крае опухолевой массы (глиомезенхимальный узел). Специфическое ингибирование фибронектинсвязывающих интегринов уменьшает миграцию опухолевых клеток [42]. Экспрессия FN1 повышена в  $CD133^+$  СКГ (см. таблицу) по сравнению с дифференцированными клетками МГБ.

Взаимодействие компонента ВКМ гиалуронана с его рецепторами HMMR и CD44, которые сверхэкспрессированы в клетках глиомы, является основным условием для инвазии глиомы [43]. Опосредованный гиалуронатом рецептор подвижности (HMMR) – это онкоген, который играет важную роль в прогрессии солидных опухолей [44]. HMMR экспрессирован практически повсеместно в образцах человеческих глиом и его экспрессия выше в МГБ, чем в глиомах более низкой злокачественности. Клеточные линии глиомы также имеют более высокий уровень HMMR, чем нормальные астроциты человека [43]. HMMR и CD44 являются двумя рецепторами для гиалуронана, важного компонента микроокружения при большинстве злокачественных опухолей. CD44 идентифицирован как маркер опухолевых стволовых клеток и непосредственно регулирует их при различных видах рака, включая глиобластому [45]. HMMR образует комплекс с CD44, который при связывании с гиалуронатом активирует внутриклеточные сигнальные пути, регулирующие выживаемость, пролиферацию и инвазию опухолевых клеток [46]. По нашим данным, уровни HMMR и CD44 повышены в  $CD133^+$  СКГ по сравнению с  $CD133^-$  ДКГ в 1,76 и 1,54 раза соответственно.

FERMT2 является важным регулятором активности интегринов, адгезии клеток к ВКМ и участвует в канцерогенезе и опухолевой прогрессии [47]. По нашим данным, уровни FERMT2 увеличены в клетках  $CD133^+$  СКГ в 3,56 раза. Механизм действия FERMT2 частично связан с уменьшением экспрессии каспазы 3 (CASP3) [48]. В нашем исследовании также отмечается снижение уровня CASP3 в клетках  $CD133^+$  СКГ в 0,45 раза по сравнению с ДКГ.

Белки ВКМ коллаген и эластин являются хорошо известными субстратами для лизилоксидазы (LOX) – подобного протеина 2 (LOXL2) [49], секретируемой медьзависимой аминоксидазы, члена семейства LOX. Повышенная экспрессия LOXL2 усиливает пролиферацию и инвазию клеток глиомы [50]. Существует взаимодействие между LOXL2 и HDAC2, а их экспрессии коррелирует между собой в образцах ткани глиомы, что подтверждает синергическую онкогенную роль этих 2 белков [50]. Таким образом, LOXL2 является перспективным прогностическим биомаркером и потенциальной терапевтической мишенью для пациентов с глиомой. По результатам нашего анализа в  $CD133^+$  СКГ наблюдается увеличение экспрессии LOXL2 и HDAC2 в 9,02 и 1,74 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с ДКГ.

Новые данные свидетельствуют о том, что фибриллы участвуют в онкогенезе [51]. Фибриллы являются первичными компонентами микрофибрилл во ВКМ многих эластичных и неэластичных соединительных тканей. Фибриллин 1 (FBN1), фибриллин 2 (FBN2) и фибриллин 3 (FBN3) составляют семейство фибриллинов. Показано, что FBN1 играет важную роль в поддержании плюрипотентности эмбриональных и опухолевых

стволовых клеток [52]. Мы наблюдали повышение уровня FBN1 в CD133<sup>+</sup> СКГ в 6,2 раза.

### Заключение

В настоящем исследовании впервые проведен сравнительный протеомный анализ CD133<sup>+</sup> СКГ и CD133<sup>-</sup> ДКГ. Основное внимание было уделено ДЭБ ВКМ-РВ, играющего важную роль в процессах диссеминации опухолевых клеток. Мы идентифицировали 1990 белков, 18 из них связаны с ВКМ-РВ. Обнаружена положительная регуляция 14 белков ВКМ-РВ в CD133<sup>+</sup> СКГ

по сравнению с CD133<sup>-</sup> ДКГ, 10 из которых (COL6A1, COL6A3, FN1, ITGA2, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, LAMB1, LAMC1) имели повышенную экспрессию более чем в 2 раза. Отмечено повышение в CD133<sup>+</sup> СКГ уровней 4 белков (FERMT2, LOXL2, HDAC2, FBN1), активирующих сигналинг ВКМ-РВ. Представленные результаты, на наш взгляд, указывают на возможность целенаправленного терапевтического воздействия на сигнальный каскад ВКМ-РВ в CD133<sup>+</sup> СКГ, что может использоваться при разработке новых схем лечения МГБ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Holland E.C. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6242–4. PMID: 10841526.
- Huse J.T., Holland E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 2010;10(5):319–31. DOI: 10.1038/nrc2818. PMID: 20414201.
- Beauchesne P. Extra-neural metastases of malignant gliomas: Myth or reality? *Cancers* 2011;3:461–77. DOI: 10.3390/cancers3010461. PMID: 24212625.
- Bolteus A.J., Berens M.E., Pilkington G.J. Migration and invasion in brain neoplasms. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2001;1(3):225–32. PMID: 11898522.
- Cuddapah V.A., Robel S., Watkins S. et al. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* 2014;15(7):455–65. DOI: 10.1038/nrn3765. PMID: 24946761.
- Claes A., Idema A.J., Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* 2007;114(5):443–58. DOI: 10.1007/s00401-007-0293-7. PMID: 17805551.
- Cayre M., Canoll P., Goldman J.E. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol* 2009;88(1):41–63. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2009.02.001. PMID: 19428961.
- Le Clainche C., Carlier M.F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 2008;88(2):489–513. DOI: 10.1152/physrev.00021.2007. PMID: 18391171.
- Huttenlocher A., Horwitz A.R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2011;3(9):a005074. DOI: 10.1101/cshperspect.a005074. PMID: 21885598.
- Roos A., Ding Z., Loftus J.C., Tran N.L. Molecular and microenvironmental determinants of glioma stem-like cell survival and invasion. *Front Oncol* 2017;7:120. DOI: 10.3389/fonc.2017.00120. PMID: 28670569.
- Kang S.K., Park J.B., Cha S.H. Multipotent, dedifferentiated cancer stem-like cells from brain gliomas. *Stem Cells Dev* 2006;15(3):423–35. DOI: 10.1089/scd.2006.15.423. PMID: 16846378.
- Chen J., McKay R.M., Parada L.F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models and stem cells. *Cell* 2012;149(1):36–47. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.009. PMID: 22464322.
- Persano L., Rampazzo E., Basso G. et al. Glioblastoma cancer stem cells: Role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol* 2013;85(5):612–22. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.10.001. PMID: 23063412.
- Ortensi B., Osti D., Pellegatta S. et al. Rai is a new regulator of neural progenitor migration and glioblastoma invasion. *Stem Cells* 2012;30(5):817–32. DOI: 10.1002/stem.1056. PMID: 22311806.
- Cheng L., Wu Q., Guryanova O.A. et al. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406(4):643–8. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.123. PMID: 21371437.
- Safa A.R., Saadatzadeh M.R., Cohen-Gadol A.A. et al. Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis* 2015;2(2):152–63. DOI: 10.1016/j.gendis.2015.02.001. PMID: 26137500.
- Tirino V., Desiderio V., Paino F. et al. Methods for cancer stem cell detection and isolation. *Methods Mol Biol* 2012;879:513–29. DOI: 10.1007/978-1-61779-815-3\_32. PMID: 22610581.
- Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S. et al. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissue-specific stem cells of humans. *Cell Transplantation* 2014;9:1–42. DOI: 10.3727/096368914X684907. PMID: 25303679.
- Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396–401. DOI: 10.1038/nature03128. PMID: 15549107.
- Beier D., Hau P., Proescholdt M. et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 2007;67(9):4010–5. PMID: 17483311.
- Beier C.P., Beier D. CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011;3:701–10. PMID: 21196345.
- Munthe S., Petterson S.A., Dahlrot R.H. et al. Glioma cells in the tumor periphery have a stem cell phenotype. *PLoS One* 2016;11(5):e0155106. DOI: 10.1371/journal.pone.0155106. PMID: 27171431.
- Cheng L., Huang Z., Zhou W. et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 2013;153(1):139–52. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.021. PMID: 23540695.
- Hambardzumyan D., Bergers G. Glioblastoma: defining tumor niches. *Trends Cancer* 2015;1(4):252–65. DOI: 10.1016/j.trecan.2015.10.009. PMID: 27088132.
- Matsukado Y., Maccarty C.S., Kernohan J.W. The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. *J Neurosurg* 1961;18:636–44. DOI: 10.3171/jns.1961.18.5.0636. PMID: 13768222.
- Muller C., Holtschmidt J., Auer M. et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci Transl*

- Med 2014;6(247):247ra101.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.3009095.  
PMID: 25080476.
27. Glass R., Synowitz M. CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. *Acta Neuropathol* 2014;128:347–62.  
DOI: 10.1007/s00401-014-1274-2.  
PMID: 24722970.
28. Wu C. Focal adhesion: a focal point in current cell biology and molecular medicine. *Cell Adhesion Mig* 2007;1(1):13–8. PMID: 19262093.
29. Arnaout M.A., Goodman S.L., Xiong J.P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19(5):495–507.  
DOI: 10.1016/j.ceb.2007.08.002.  
PMID: 17928215.
30. Humphries J.D., Byron A., Humphries M.J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 19):3901–3.  
DOI: 10.1242/jcs.03098.  
PMID: 16988024.
31. Madamanchi A., Santoro S.A., Zutter M.M. alpha2beta1 Integrin. *Adv Exp Med Biol* 2014;819:41–60.  
DOI: 10.1007/978-94-017-9153-3\_3.  
PMID: 25023166.
32. Danen E.H. Integrins: regulators of tissue function and cancer progression. *Curr Pharm Des* 2005;11(7):881–91.  
PMID: 15777241.
33. Xie J.J., Guo J.C., Wu Z.Y. et al. Integrin alpha5 promotes tumor progression and is an independent unfavorable prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2016;48:69–75.  
DOI: 10.1016/j.humpath.2015.09.029.  
PMID: 26772401.
34. Feng L., Ma J., Ji H. et al. miR-330-5p suppresses glioblastoma cell proliferation and invasiveness through targeting ITGA5. *Biosci Rep* 2017;37(3).  
DOI: 10.1042/BSR20170019.  
PMID: 28336765.
35. Skuli N., Monferran S., Delmas C. et al. Alphavbeta3/alphavbeta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res* 2009;69(8):3308–16.  
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2158.  
PMID: 19351861.
36. Desgrosellier J.S., Cheresh D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010;10(1):9–22. DOI: 10.1038/nrc2748.  
PMID: 20029421.
37. Klekner Á., Hutóczy G., Virga J. et al. Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain. *Clin Neurol Neurosurg* 2015;139:138–43.  
PMID: 26451999.
38. Serres E., Debarbieux F., Stanchi F. et al. Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane *in vitro* and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene* 2014;33(26):3451–62.  
DOI: 10.1038/onc.2013.305.  
PMID: 23912459.
39. Ryan M.C., Christiano A.M., Engvall E. et al. The functions of laminins: lessons from *in vivo* studies. *Matrix Biol* 1996;15(6):369–81. PMID: 9049976.
40. Caffo M., Germanò A., Caruso G. et al. An immunohistochemical study of extracellular matrix proteins laminin, fibronectin and type IV collagen in paediatric glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien)* 2004;146(10):1113–8.  
DOI: 10.1007/s00701-004-0344-y.  
PMID: 15309586.
41. Yu Q., Xue Y., Liu J. et al. Fibronectin promotes the malignancy of glioma stem-like cells via modulation of cell adhesion, differentiation, proliferation and chemoresistance. *Front Mol Neurosci* 2018;11:130. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00130. PMID: 29706869.
42. Yeh W.L., Lu D.Y., Liou H.C. et al. A forward loop between glioma and microglia: glioma-derived extracellular matrix-activated microglia secrete IL-18 to enhance the migration of glioma cells. *J Cell Physiol* 2012;227(2):558–68.  
DOI: 10.1002/jcp.22746.  
PMID: 21442623
43. Wiranowska M., Ladd S., Moscinski L.C. et al. Modulation of hyaluronan production by CD44 positive glioma cells. *Int J Cancer* 2010;127(3):532–42.  
DOI: 10.1002/ijc.25085. PMID: 19957333.
44. Turley E.A., Noble P.W., Bourguignon L.Y. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 2002;277(7):4589–92.  
DOI: 10.1074/jbc.R100038200.  
PMID: 11717317.
45. Anido J., Saez-Borderias A., Gonzalez-Junca A. et al. TGF-beta receptor inhibitors target the CD44(high)/Id1(high) glioma-initiating cell population in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2010;18(6):655–68. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.10.023. PMID: 21156287.
46. Hamilton S.R., Fard S.F., Paiwand F.F. et al. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm(CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282(22):16667–80.  
DOI: 10.1074/jbc.M702078200.  
PMID: 17392272.
47. Zhao T., Guan L., Yu Y. et al. Kindlin-2 promotes genome instability in breast cancer cells. *Cancer Lett* 2013;330(2):208–16.  
DOI: 10.1016/j.canlet.2012.11.043.  
PMID: 23211537.
48. Ghoobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005;55(3):178–94. PMID: 15890640.
49. Kim Y.M., Kim E.C., Kim Y. The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. *Mol Biol Rep* 2011;38(1):145–9.  
DOI: 10.1007/s11033-010-0088-0.  
PMID: 20306300.
50. Du X.G., Zhu M.J. Clinical relevance of lysyl oxidase-like 2 and functional mechanisms in glioma. *Onco Targets Ther* 2018;11:2699–708. DOI: 10.2147/OTT.S164056. PMID: 29785119.
51. Guo Q., Song Y., Zhang H. et al. Detection of hypermethylated fibrillin-1 in the stool samples of colorectal cancer patients. *Med Oncol* 2013;30(4):695.  
DOI: 10.1007/s12032-013-0695-4.  
PMID: 23963856.
52. Cierna Z., Mego M., Jurisica I. et al. Fibrillin-1 (FBN-1) a new marker of germ cell neoplasia *in situ*. *BMC Cancer* 2016;16:597. DOI: 10.1186/s12885-016-2644-z. PMID: 27487789.

#### Вклад авторов

В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, протеомный анализ лизатов опухолевых клеток, анализ литературы, написание текста рукописи;

И.С. Брюховецкий: биоинформационный анализ полученных данных;

Е.А. Савченко: получение CD133<sup>+</sup> стволовых клеток глиомы и CD133<sup>-</sup> дифференцированных клеток глиомы;

Н.Е. Арноцкая: подготовка образцов для протеомного анализа.

#### Authors' contributions

V.E. Shevchenko: developing the research design, proteomics analysis of tumor cell lysate, literature analysis, article writing;

I.S. Bryukhovetskiy: bioinformatics analysis of the obtained data;

E.A. Savchenko: preparation of glioma CD133<sup>+</sup> stem cells and glioma CD133<sup>-</sup> differentiated cells;

N.E. Arnotskaya: sample preparation for proteomics analysis.



**ORCID авторов/ORCID of authors**

В. Е. Шевченко/V. E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>

И. С. Брюховецкий/I. S. Bryukhovetskiy: <https://orcid.org/0000-0003-3654-3069>

Е. А. Савченко/E. A. Savchenko: <https://orcid.org/0000-0003-1433-5533>

Н. Е. Арноцкая/N. E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
**Financing.** The study was performed without external funding.

## Памяти Ирины Борисовны Зборовской 07.01.1952–09.02.2019

Ирина Борисовна работала в НИИ канцерогенеза с 1975 г. и посвятила науке большую часть своей жизни. Она стояла у истоков развития молекулярной диагностики онкологических заболеваний в России, активно разрабатывала принципы создания молекулярного портрета опухоли как основы для персонализированной противоопухолевой терапии. Ирина Борисовна является автором более 100 публикаций в отечественных и зарубежных изданиях, была руководителем многочисленных проектов, поддержанных грантами научных фондов, грантами правительства России и др., членом международных и российских онкологических научных организаций. В течение 10 лет (с 2004 по 2014 г.), пока позволяло здоровье, возглавляла лабораторию регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза. Под ее руководством выросла целая плеяда исследователей, которые



**9 февраля 2019 г. после тяжелой болезни ушла из жизни выдающийся специалист в области молекулярной онкологии, ведущий научный сотрудник НИИ канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, заместитель главного редактора журнала «Успехи молекулярной онкологии» Ирина Борисовна Зборовская**

успешно работают как в НИИ канцерогенеза, так и в научных коллективах ведущих исследовательских центров России, Германии, Великобритании, Франции, США.

Невозможно переоценить вклад Ирины Борисовны в работу НИИ канцерогенеза, его научную жизнь и творческую атмосферу. На протяжении многих лет она была постоянным членом Объединенного ученого совета Центра и Ученого совета НИИ канцерогенеза, внесла огромный вклад в создание и работу журнала «Успехи молекулярной онкологии», являясь заместителем главного редактора. Ирина Борисовна была одним из активных организаторов ежегодной Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, проводимой на базе НИИ канцерогенеза. Во многом благодаря ее усилиям конференция стала одним из ведущих отечественных форумов в области молекулярной онкологии.

**Ирина Борисовна была замечательным человеком – талантливым, великодушным, отзывчивым, чутким и мудрым.**

**Кончина Ирины Борисовны – огромная и невозполнимая утрата для друзей, коллег, учеников и всего Института. Светлая память о ней всегда будет жить в наших сердцах.**